



METOODILISED JUHENDID BIOLOOGILISES KEEMIAS

arstiteaduskonna farmaatsia
ja stomatoloogia osakonna üliõpilastele

I

1989

METOODILISED JUHENDID BIOLOOGILISES KEEMIAS

arstiteaduskonna farmaatsia
ja stomatoloogia osakonna üliõpilastele

I

Teine, parandatud trükk

Kinnitatud arstiteaduskonna nõukogus 15. novembril 1988.a.

Koostajad: M.Zilmer, T.Vihalemm, L.Tähepõld

Vormistas: V.Suvi

Tartu Riikliku Ülikooli
Raamatukogu
N

МЕТОДИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ ДЛЯ СТУДЕНТОВ
МЕДИЦИНСКОГО ФАКУЛЬТЕТА ОТДЕЛЕНИЯ ФАРМАЦИИ И СТОМАТОЛОГИИ. I.

Изд. 2-е, исправл.

Составители Михкел Ц и л м е р и др.

На эстонском языке.

Тартуский государственный университет,
ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Ülikooli, 18.

Vastutav toimetaja E. Karelson.

Paljundamiseks antud 30.11.1988.

Formaat 60x84/16.

Rotaatoripaber.

Masinakiri. Rotaprint.

Tingtrükipoognaid 9,30.

Arvestuspoognaid 9,11. Trükipoognaid 10,0.

Trükiarv 600.

Tell. nr. 1031.

Hind 30 kop.

TRÜ trükikoda. ENSV, 202400 Tartu, Tiigi t. 78.

SISSEJUHATUS

Kaasaegsel proviisorite ettevalmistamisel pööratakse erilist tähelepanu meditsiinilis-bioloogilistele teadustele, millede hulgas biokeemiale kuulub fundamentaalne koht. Tule-nevalt uuest õppeprogrammist on biokeemia kursuse põhisuks farmaatsiaosakonna üliõpilastele raku bioloogiliste struk-tuuride organisatsiooni füüsikalise-keemilised alused, elute-gevuse ja selle häirete molekulaarsed mehhanismid, ravimite muundumise ensümaatilised protsessid ja uudsena haiguste diagnoosimise biokeemilised printsiibid ja nende rakendamine farmakoteraapias.

Käesolev biokeemia meetodiliste juhendite I osa on ka-vandatud mitte ainult laboratoorsete tööde sooritamiseks, vaid ka biokeemia kursuse järjepidevaks iseseisvaks oman-da-miseks. Selleks on juhendites toodud rida teoreetilisi küsi-musi, mis koos loengukursusel esitatava materjaliga on kursu-se omandamise aluseks. Aine süstemaatiliseks omandamiseks on igas teoreetilis-laboratoorses töös antud vajalik teadmiste algtase, probleemide teoreetiline käsitus, mida täiendavad loengumaterjal, vastavad selgitavad joonised-skeemid, labora-toorsete tööde teostamise juhendid ja kontrollküsimused tead-miste kontrolliks. Rõhutame vajadust regulaarseks ettevalmis-tuseks igaks praktikumiks kõikide antud teema komponentide osas.

Aja kokkuhoiu ja laboratoorsete tööde lahtimõtestamise eesmärgil on vajalik praktikumi ettevalmistamise käigus koos-tada protokoll, kandes sinna antud töö põhiprintsiibi, töö käigu ja jättes ruumi saadud tulemuste fikseerimiseks ja üldistamiseks.

Koostajad

Teoreetiline praktikum nr. 1

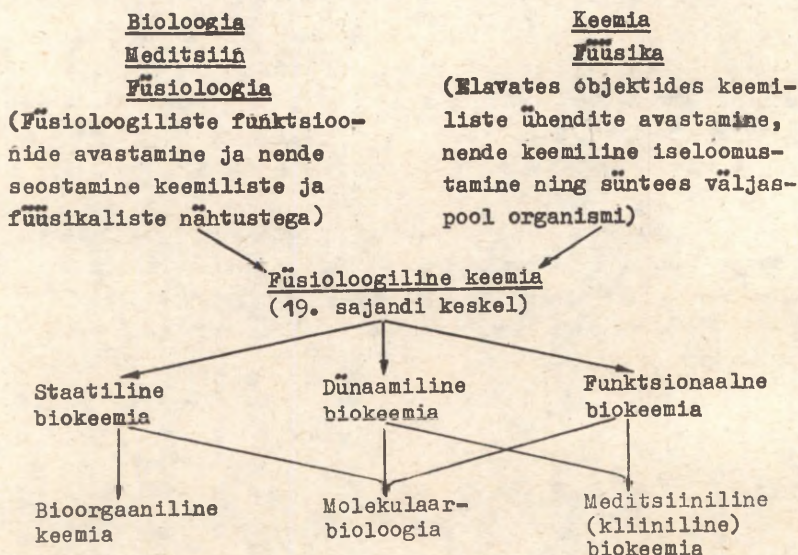
Teema: BIOKEEMIA TREKKE JA ARENGU LÜHIAJALUGU. BIOKEEMIAS
KÄRKASUTATAVAD FÜSIKALIS-KEEMILISED MEETODID.

Teadmiste algtase:

1. Keemia osa elusorganismide keemilise koostise ja talitluste uurimisel ning mõistmisel.
2. Füüsikalis-keemilised parameetrid ja meetodid biopolümeeride jt. elusorganismi koostisse kuuluvate molekulide uurimisel.
3. Põhimõisted bioanorgaanilisest keemiast (isoelektriline punkt, adsorptsioon, desorptsioon, adsorbent, adsorptiiv, difusioon, osmoos, osmootne rõhk, ioonvahetajad, geelid ja soolid).

Biokeemia on teadus elava matera keemilisest koostisest ja elutegevuse aluseks olevatest elusorganismis kulgevatest keemilistest protsessidest.

Biokeemia kui teaduse tekke ja arengu võiks lihtsustatult esitada järgmise skeemina:



Nagu näeme, on ajaloolises arengus välja kujunenud kolm tihedasti läbipõimunud biokeemia põhisuunda - staatiline, dünaamiline ja funktsionaalne biokeemia. Nimetatud suundade baasil, nende arengus ja omavahelises seostuses tekkisid kaasaegsed spetsiifilised suunad - bioorgaaniline keemia, molekulaarbioloogia ja medikute ning farmatseutide seisukohalt oluline meditsiiniline biokeemia.

Vaatleme järgnevalt biokeemia kolme põhisuuna ajaloolist arengut.

Staatiline biokeemia (SB) uurib elusorganismide koostisse kuuluvate ühendite keemilist struktuuri ja füüsikaliskeemilisi omadusi. SB tekke eelduseks oli keemiline lähene-mine elavale materiale, mis algas rohkem kui 200 aastat tagasi. Tinglikult võiks SB arengus eristada järgmisi etappe:

1. etapp: Esimeste orgaaniliste ühendite isoleerimine elavatest objektidest ja nende organismivälise sünteesi võimalikkuse tõestamine

1770-1786 Scheele - isoleeris glütserooli ja terve rea orgaanilisi happeid.

1828 Wöhler - sünteesis, lähtudes anorgaanilistest ühenditest, elusorganismidele omase orgaanilise ühendi - karbamiidi. See töö andis purustava hoobi vitalismile, mis väitis, et organismis leiduvate ühendite "in vitro" süntees pole võimalik, kuna nad luuakse jumaliku elujõu - "vis vitalis" abil.

2. etapp: Makromolekulide isoleerimise ja puhastamise algus

1890 Hofmeister - eraldas kristalsena esimese valgu (muna albumiini).

1926 Sumner - isoleeris kristalsena esimese ensüümi (ureaas).

3. etapp (kaasaegne): Makromolekulide (biopolümeeride) keemilise struktuuri selgitamine ning nende laboratoorne süntees. Sellesse etappi jõudis SB tänu uute kõrgeltselektiivsete füüsikaliskeemiliste lahutusmeetodite väljatöötamisele

ning rakendamisele (vt. lk. 9) ning füüsika, keemia, kristallograafia ja arvutustehnika arengule

- 1951 Pauling - töestas α -heeliksi kui valkude sekundaarstruktuuri põhitüübi
- 1943-1953 Sanger - tegi kindlaks insuliini primaarstruktuuri
- 1953 Wilkins, Watson, Crick - töestasid DNA kaksik-helikaalsuse
- 1957 Ochoa - teostas RNA ensümaatilise sünteesi
- 1967 Kornberg - teostas bioloogiliselt aktiivse DNA ensümaatilise sünteesi
- 1969 Shapiro - isoleeris geeni.

20. sajandi 70-ndatel aastatel kujunes looduslike ühendite keemia ja SB baasil välja bioorgaaniline keemia kui SB kaasaegne suund, mis uurib elutegevuse aluseks olevate ja elutegevust mõjutavate orgaaniliste ühendite ehitust ja reaktsioonivõimet seostatuna nende ühendite bioloogiliste funktsioonidega. Bioorgaanilise keemia ülesanne oleks seega elusraku funktsioneerimise füüsikalis-keemiliste aluste väljaselgitamine.

Dünaamiline biokeemia (DB) uurib ainevahetust, metabolismi (katabolism, anabolism, bioenergeetika) ja selle regulatsiooni mehhanisme. DB üldise biokeemia tsentraalse suunana käsitleb seega ainete saatust elusorganismides. DB tekke eelduseks oli SB ja füsioloogilise keemia edasine areng.

DB arengut võib tinglikult jagada järgmistesse etappidesse:

1. etapp: Esmaste bioloogilise oksüdatsiooni seaduspärasuste avastamine
- XVIII s. 50-dad aastad Lomonossov - avastas aine ja energia jäävuse seadused
- 1770-1774 Priestley - avastas hapniku ja näitas, et loomorganismid neelavad, taimed aga eritavad hapnikku
- 1780-1789 Lavoisier - kõrvutades orgaaniliste ühendite põlemist elusorganismide hingamisega

tõestas, et toidu orgaanilised komponendid "põlevad" elusorganismides aeglaselt, moodustades samasuguseidprodukte kui väljaspool organismi - vesi, CO_2 ja soojus.

2. etapp: Käärimise seaduspärasuste avastamine, mille-ga kaasnes biokatalüsaatorite (ensüümide) avastamine ja nende funktsioonide täpsustamine (siia kuuluvad Kirchoffi, Schwann'i, Pasteur'i Buchner'i jt. tööd, vt. ensümoloogia peatükk).

3. etapp: Metaboolsete radade avastamise algus*

1905 Knoop - avastas rasvhapete β -oksüdatsiooni

1931 Engelhardt - avastas hingamise ja ATP moodustumise seostatuse

1933 Krebs, Henseleit - avastasid ornitiintsükli

1937 Krebs - avastas trikarboksüülhapete tsükli (TKT)

1937 Braunstein, Kritzman - avastasid transamiinimise.

4. etapp (kaasaegne): algasid fundamentaalsed tööd valkude ja nukleinhapete biosünteesi, bioenergeetika, metabolismi regulatsiooni jt. aladel. XX s. 60-teks aastateks asuti koostama metaboolseid kaarte, mis kuni tänini on kiiresti täiustunud ja komplitseerunud.

1939-1941 Lipmann - eeldas, et elusraku energeetilises tsüklis kesket osa etendab ATP

1947-1950 Lipmann ja Kaplan - isoleerisid ja iseloomustasid koensüüm A

1952-1954 Zamecnik jt. - avastasid ribonukleoproteiinsed kompleksid (ribosoomid) ja näitasid, et seal toimub valkude biosüntees

1961 Nirenberg, Ochoa - tõestasid geneetilise koodi

1961 Monod, Jacob, Changeux, Pardue - postuleerisid allosteerilise regulatsiooni põhiprintsiibid

1957-1965 Sutherland - avastas tsükliliste nukleotiidide olulise osa hormoonide toimemehhanismis.

Funktsionaalse biokeemia (FB) sisuks on biomolekulide, nende metabolismi ja selle regulatsiooni uurimine seoses

* 1903 Neuberg - võttis kasutusele termini "biokeemia".

elusorganismide ning tema struktuuride (elundid, koed, dife-
rentseeritud rakud) spetsiifiliste talitlustega (funksioo-
nidega).

- 1850-1860 Claude Bernard - IV ajuvatsakese põhja mehhaani-
line ärritamine põhjustab maksa glükogeenist
glükoosi teket ja viimase üleminekut verre. Jä-
relilikult on närvisüsteemi erutuse resultaa-
diks keemiline reaktsioon.
- 1892-1896 Pavlov, Nencki - katsetes koertel fistuli raja-
misega väratüveni ja alumise õõnesveeni vahele
näitasid, et maksast mööda juhitud ammoniak
avaldab toksilist toimet kesknärvisüsteemi funkt-
sioonile ja tema kahjutustamine toimub maksas
karbamiidi sünteesi kaudu.
- 1939-1942 Engelhardt, Ljubimova - näitasid, et müofibril-
lide müosiin ei ole ainult kontraktiilne valk,
vaid ka ensüüm adenosinintrifosfataas, mille abil
kasutatakse ATP energiat lihaskontraktsiooniks.
- 1957-1965 Sutherland - avastas tsükliliste nukleotiidide
füsioloogilise rolli informatsiooni sekundaar-
sete vahendajatena.

Meditisiinilise (kliinilise) biokeemia teke oli seotud
SB, DB ja FB arenguga. Kaasajal kasutab ta ka bioorgaanilise
keemia ja molekulaarbioloogia saavutusi.

Meditisiiniline biokeemia uurib inimorganismi füsiolo-
giliste funktsioonide molekulaarseid aluseid, haiguste pato-
geneesi molekulaarseid mehhanisme (molekulaarpatoloogia),
haiguste profülaktika ja ravi biokeemilisi aluseid, aga ka
biokeemiliste meetodite rakendamist diagnostikas ning ravi
efektiivsuse hindamisel.

Molekulaarbioloogia tekkis biokeemia arengu baasil XX s.
50-datel aastatel kui elusorganismide uurimise ja tunnetami-
se uus tasand. Tema teke oli seotud rea fundamentaalsete töö-
dega (Sanger, Watson, Crick, Wilkins, Nirenberg, Ochoa jt.).

Molekulaarbioloogia tegeleb kõrgmolekulaarsete biomole-
kulide (nukleiinhapped, valgud, ensüümid jt.) struktuuri ja
omaduste kui bioloogiliste funktsioonide aluse uurimisega.

Selles osas on ta lähedane bioorgaanilisele keemiale. Kaasajal pöörab molekulaarbioloogia üha rohkem tähelepanu geneetilise informatsiooni ülekande mehhanismide detailsele uurimisele (molekulaargeneetika) ja geenide tehislíkule isoleerimisele ning kasutamisele (insenergeneetika, biotehnoloogia).

Põhilised füüsikalís-keemilised meetodid biomolekulide lahutamiseks, isoleerimiseks ja puhastamiseks

Biomolekulide (valgud, ensüümid, nukleinhapped, sahariidid, lipiidid jt.) lahutamiseks, isoleerimiseks ja puhastamiseks kasutatakse kaasajal mitmesuguseid füüsikalís-keemilisi meetodeid, mida võib tinglikult liigitada järgmiselt.

I Suhteliselt madalselektiivsed meetodid. Elimineerivad enamuse ballastkomponente ja annavad fraktsiooni, milles valdavaks on isoleeritav komponent.

1. Fraktsioneeriv sadestamine erineva ioontugevuse toimel. Põhineb biomolekulide (esijoonel valkude) erineval lahustuvusel sõltuvalt ioontugevusest (elektrolüütide kontsentratsioonist). Näiteks sadenevad vereseerumi või munavalgulahuse globuliinid $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ poolküllastuse, albumiinid aga täisküllastuse juures (vt. praktikum nr. 2).

2. Sadestamine orgaaniliste lahustitega (atsetoon, etanool, metanool, kloroform, tetrakloorsüsinik jt.). Kui isoleeritav komponent on kergesti denatureeruv (näit. valk), teostatakse sadestamine madalate temperatuuridega (0 kuni $+4^\circ\text{C}$). Rakendatakse valkude, lipiidide jt. lahutamiseks.

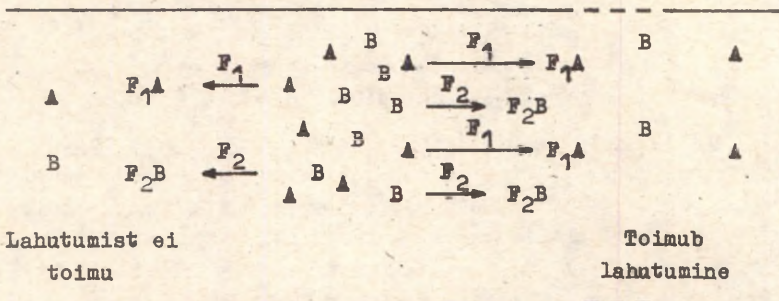
3. Isoelektriline sadestamine. Amfoteersete ühendite (põhiliselt valgud) lahustuvus on reeglina minimaalne nende isoelektrilise punkti (pI) piirkonnas. Seetõttu saab pH väärtusel, mis vastab antud ühendi pI-le, viia ta sademisse, enamik ballastkomponente jääb aga lahusesse.

II Kõrgema selektiivsusega astmelised meetodid. Võimaldavad isoleerida praktiliselt homogeense üksikkomponendi. Neid meetodeid iseloomustab menetluse astmelisus (kaskadus), st. et lahutatav komponentide segu allub paljudele

lahutamise üksikstaadiumidele, mis tagabki segust üksikkomponentide isoleerimise.

Meetodite üldpõhimõte on järgmine (joon. 1.):

Komponentide (A ja B) segu liigub lahusti manulusel spetsiaalses ruumis, kanalis või kandjal. Kui komponentide molekulidele toimib võrdne liikumapanev jõud (F_1 , F_2), nad ei lahutu. Kui aga liikumapanev (või siduv) jõud komponentide suhtes on erinev, toimub nende järkjärguline lahutamine kuni täieliku eraldumiseni. Ruumi, kanali või kandja teatud lõiku vastaval ajamomendil peale lahutamise algust võib vaadelda lahutamise üksikstaadiumina, millede küllaldane arv tagab kõikide komponentide lahutamise.



Joonis 1. Astmelise lahutamise põhimõte (noolte pikkus näitab F_1 ja F_2 suurust).

Sõltuvalt liikumapanevast või siduvast jõust saab kõrgema selektiivsusega astmelisi lahutamismeetodeid klassifitseerida järgmiselt (tabel 1).

Tabel 1

Astmeliste meetodite klassifikatsioon

Meetod	Liikumapanev jõud	Siduv jõud	Lahutamisele mõjuvad faktorid
1. Vastuvoolu-jaotumine (kasutatav ka jaotuskromatograafiana)	Mehhaaniline	Jõud, mis määravad faaside vahelise jaotumise iseloomu	Lahustuvus mit-tesegunevais vedelikes

Meetod	Liikuma- panev jõud	Siduv jõud	Lahutamisele mõ- juvad faktorid
2. Kromatograafia			
2.1. Adsorptsioon- kromatograa- fia	Hüdro- dünaa- miline	Adsorptsiooni pinnaenergia	Lahutatavate kom- ponentide ja ad- sorbendi struk- tuursed iseara- sused
2.2. Ioonivahetus- kromatograa- fia	Hüdro- dünaa- miline	Elektrostaatiline	Ioonivahetaja ja lahutatavate kom- ponentide ioonne loomus
2.3. Jaotuskroma- tograafia	Hüdro- dünaa- miline	Jõud, mis mää- ravad faaside vahelise jaotumise	Lahustuvus mitte- segunevais vede- likes
2.4. Gaaskromato- graafia	Mehhaa- niline	Jõud, mis mää- ravad faaside vahelise jaotumise	Gaasiliste aine- te lahustuvus vedeliku-faasis
2.5. Afiinsuskro- matograafia	Hüdro- dünaa- miline	Mittekovalent- sed vastastiku- kused toimed	Lahustunud aine- te spetsiifilised vastastikused toimed adsor- bendiga
2.6. Geelkromato- graafia	Hüdro- dünaa- miline	Jõud, mis mää- ravad jaotumi- se lahusti faaside vahel kandja graanulite sees ja väljas	Molekulide vormi ja mõõtmete eri- nevused
3. Elektroforees			
3.1. Frontaalne	Elektro- staatiline	Molekulide hõõrdumine	Komponentide ioonised omadused
3.2. Tsonaalne	- " -	- " -	Komponentide ioonised omadused ja molekulmass
3.3. Isotahho- forees	- " -	- " -	Komponentide ioonised omadused
3.4. Isoelektri- line foku- seerimine	- " -	- " -	Komponentide amfioletsus
4. Ultratsentri- tuugimine	Tsentri- fugaal- jõud	Difusioon	Komponentide mõõtmel, tihedus ja molekulmass

1. Vastuvoolujaotumine. Jaotuslehtrisse, milles on kaks mittesegunevat vedelikku (näit. butanool ja vesi), viiakse lahutatav segu. Peale loksutamist jäävad lahutatavad komponendid erinevalt ülemisse (butanool) ja alumisse faasi (vesi) vastavalt oma jaotuskoefitsiendile K

$$K = \frac{c_1}{c_2}$$

c_1 = aine kontsentratsioon butanooli faasis

c_2 = aine kontsentratsioon vee faasis

Järgneb vastuvooluülekanne: butanooli faas viiakse ainult vett sisaldavasse jaotuslehtrisse ja vee faas ainult butanooli sisaldavasse jaotuslehtrisse. Peale loksutamist järgneb uus vastuvooluülekanne. Selliste ülekannete piisav arv (50-100) tagab isoleeritavate komponentide lahutamise. Lisagem, et igat jaotuslehtrit võib vaadelda kui ühte lahutusstaadiumi ning et lahutunud komponentide ülekanne on mehhaaniline (kaasajal on protsess automatiseeritud).

2. Kromatograafia. See väga selektiivne lahutusmeetod baseerub põhimõttel, et segu lahutamine üksikkomponentideks toimub lahutatavate komponentide paljukordsel ümberjaotumisel liikuva ja liikumatu faasi vahel.

Segu komponentide lahutamise aluseks võivad olla nende mitmed parameetrid: adsorptsioonikoefitsient, lahustuvus, võime ioonvahetuseks, jaotumine, molekulide mõõtmed jt. Kromatograafiat võib läbi viia kolonides, kapillaarides, mitmesugustel kandjatel jne. Sõltuvalt lahutamise printsiibist ning teostamise tehnikast eristatakse järgmisi kromatograafia tüüpe.

2.1. Adsorptsioonkromatograafia. Põhineb komponentide selektiivsel adsorptsioonivõimel antud adsorbendil (adsorptsioonivõime määravad hüdrofoobsed jõud, dipoolsed interaktsioonid, vesiniksidemed). Sageli kombineerub adsorptsioon jaotumisega. Tüüpiline lahutamine toimub sel juhul järgmiselt. Vett sisaldava adsorbendiga täidetud kolonni kantakse lahutatav segu (näit. butanoolis), mis sisestub kolonni ülalosas adsorbenti kitsa vööndina raskusjõu või nõrga vaakumi toimel. Järgneval kolonni aeglasel voolutamisel butanooliga (elutsioon) toimub lahutatavate komponentide ümber-

jaotumine liikuva faasi (butanool) ja liikumatu faasi (adsorbent koos tema osakestel oleva veekihiga) vahel. Teisiti öeldes: pidevalt pealevoolav lahusti (nimetatakse ka eluendiks) haarab kaasa nõrgemini adsorbeerunud komponendid ja kannab neid kolonnis allapoole, kus nad uuesti adsorbeeruvad. Et taoline protsess toimub paljukordselt, lahutuvad komponendid mööda kolonni allapoole liikumisel ja väljuvad sealt kindlas järjekorras: mida nõrgemini antud komponent antud adsorbendil adsorbeerub, seda kiiremini väljub ta kolonnist. Kogudes kolonnist väljuvat lahustit fraktsioonideks, saadakse kätte kindlat komponenti sisaldav fraktsioon. Sellist kromatograafiameetodit nim. kolonnkromatograafiaks.

Teine levinuim kombineeritud adsorptsiooni- ja jaotuskromatograafia meetod on õhukese kihi kromatograafia, mille puhul adsorbent on õhukese kihina kantud mingile alusele (näit. klaasplaadile). Lahutatav segu kantakse plaadi serva lähedal olevale stardijoonele, misjärel plaadi serv viiakse lahustisse. Selle liikumisel mööda plaati kordub kolonnkromatograafia juures kirjeldatud lahutumisprotsess. Teatud aja järel voolutamine katkestatakse ning plaati töödeldakse ilmutiga, mis teeb värvusetud lahutatavad komponendid nähtavaks värviliste laikudena. Tundmatute komponentide identifitseerimiseks kasutatakse paralleelselt tuntud testkomponente.

2.2. Ioonivahetuskromatograafia. Põhineb ioonide vahetamisel lahusti (liikuv faas) jaioonivahetaja e. iioniidi (liikumatu faas, tahke kandja) vahel. Kui ioniit sisaldab negatiivselt laetud rühmi, siis iioniidi eeltöötluse käigus seostuvad nende rühmadega katioonid. Sellist ioniiti nimetatakse kationiidiks. Kui kanda kolonnis sisalduvale kationiidile lahutatav segu, siis seostuvad positiivselt laetud komponendid (katioonid) kationiidi negatiivsete rühmadega, tõrjudes nendelt välja ekvivalentse hulga katioone (toimub katioonide vahetus), mis kaasneb lahutatavate katioonide selektiivse adsorptsiooniga. Adsorbeerunud katioonseid komponente on võimalik kolonnist elueerida erineva katioontugevusega soolalahustega, kuna iga lahutatav komponent eluseerub erineva katioontugevuse juures.

Analooiline tööprintsip on ka anioone vahetaval ioonidil e. anioniidil.

2.3. Jaotuskromatograafia. Tahke vettsisaldava inertse kandjaga täidetud kolonni viiakse lahutatav segu. Voolutades kolonni veega mitteseguneva vedelikuga (voolutiga), toimub lahutatavate komponentide paljukordne ümberjaotumine vooluti (liikuv faas) ja liikumatu faasi (tahke kandjaga seotud vesi) vahel vastavalt iga lahutatava komponendi jaotuvusele neis faasides (vt. vastuvoolujaotumine). Kolonnist väljub vedelik kogutakse fraktsioonidena (mida parem on antud komponendi lahustuvus liikuvas faasis, seda kiiremini ta kolonnist väljub) ning fraktsioonides määratakse antud komponendi hulk. Analooiliselt adsorptsioonkromatograafiale nimetatakse seda jaotuskromatograafia alaliiki kolonnkromatograafiaks.

Levinuimaks jaotuskromatograafia alaliigiks on paberkromatograafia. Sel juhul lahutatavad ja testkomponendid polaares lahustis (vesi) fikseeritakse polaarse kromatograafiapaberi (eriline filterpaberi sort) stardijoonel (3-4 cm paberi servast). See serv sisestatakse liikuvasse faasi, voolutisse, milleks kasutatakse lahustite segu (n-butanool-aadikhape-vesi; fenool-vesi-ammoniaak jt.). Kromatograafiapaber asetatakse hermeetiliselt suletud kambrisse. Kui vooluti liigub ülalt alla, on tegemist langeva paberkromatograafiaga, kui alt üles - tõusva paberkromatograafiaga. Vooluti liikumisel mööda paberi toimub paljukordne lahutuvate komponentide ümberjaotumine liikumatu faasi (paberiga, st. tselluloosiga, seotud vesi) ja liikuva faasi vahel, mis viib teatud aja jooksul komponentide lahutumisele. Protsess lõpetatakse vooluti frondi jõudmisel 2-3 cm kaugusele stardijoonest vastasäärest ning peale paberi kuivatamist teostatakse ilmumine (värvimine spetsiifiliste värvidega). Järgnevalt leitakse uuritavate ja testkomponentide jaotumiskoeffitsiendid (Rf):

$$Rf = \frac{a}{b}$$

a - antud komponendi liikumiskaugus stardijoonest, mm

b - vooluti frondi liikumiskaugus stardijoonest, mm

Kuna Rf on antud tingimustes püsiv suurus, siis on test-

komponentide Rf määramise kaudu võimalik identifitseerida tundmatuid lahutunud komponente nende Rf järgi.

2.4. Gaaskromatograafia (sageli kasutusel gaas-vedelik-kromatograafiana). Jaotuskromatograafia alaliik, mille puhul liikumatuks faasiks on mittelenduva vedelikuga (glütserool, polüetüleenglükool jt.) läbiimmutatud tahke kandja, liikuvaks faasiks aga mingi inertgaas (vesinik, argoon, heelium jt.). Lahutatav segu viiakse gaasi (või auru) kujul liikuvasse faasi ning lastakse läbi liikumatut faasi sisaldava kolonni. Toimub lahutatavate komponentide paljukordne ümberjaotumine kahe faasi (gaas-vedelik) vahel. Kuna lahutatavate komponentide jaotuskoefitsiendid neis faasides on erinevad, väljuvad nad kolonnist individuaalsete fraktsioonidena liikuva faasi (inertgaasi) voolus. Väljuvaid komponente identifitseeritakse spetsiaalse automaatse detektoriga vastavate füüsikalise-keemiliste omaduste muutuste järgi ning tulemused registreeritakse vastavate diagrammidena isekirjuti abil.

2.5. Afiinsuskromatograafia. Põhineb komponentide bioloogilisel spetsiifilisusel, nende võimel spetsiifiliselt siduda ainult teatud kindlat ligandi. Selliselt seovad immunoglobuliinid antigeene, ensüümid substraate, koensüüme, inhibiitoreid, retseptoreid hormone ja mediaatoreid jne. Tahkelaadsele seotakse kovalentselt vajalik ligand, mis seob lahutatavast segust vaid temale spetsiifilise komponendi, teised komponendid väljuvad kolonnist koos voolutiga. Adsorbeerunud komponent elueeritakse vooluti pH, ioontugevuse jt. parameetrite muutmisega.

2.6. Geelkromatograafia (geelfiltratsioon). Põhineb sellel, et sõltuvalt molekuli suurusest ja kujust läbivad lahutatavad komponendid geelmatriitsi (sünteesiline või tugevasti hüdratiseerunud polüsahhariid) erineva kiirusega. Kolonnis valmistatakse geel, mille graanulitel (liikumatu faas) on kindla läbimõõduga poorid. Sellest tingituna tekib lahutatav segu kanda graanulite sees, teine väljas. Kui lahutatav segu kanda kolonnile, siis pooridest väiksemad molekulid jaotuvad mõlemasse lahusti faasi (tungivad ka graanulitesse), pooridest suuremad molekulid aga graanulitesse ei

pääse. Seega töötavad sellised graanulid molekulaarse sõelana, lahutades komponente molekuli suuruse ja kuju alusel. Kuna suured molekulid graanulitesse ei pääse, läbivad nad ainult graanulitevahelise tee ning väljuvad kolonnist kiiremini kui väikesed molekulid, millede tee pikeneb graanulitesse tungimise tõttu. Geelmatriitsina kasutatakse sünteetiliselt vaike, poorset klaasi, kaasajal põhiliselt polüsahharide (dekstraanid e. sefadeksid, agaros), mis sisestatakse geeli valmistamisel sobivatesse lahustitesse.

3. Elektroforees. Elektroforees on elektrokineetiline protsess, milles laetud osakesed (faasid) liiguvad välise alalisvoolu elektrivälja toimel elektroodidele: katioonid liiguvad negatiivselt laetud elektroodile - katoodile, anioonid positiivselt laetud elektroodile - anoodile. Komponentide lahutamise aluseks on nende erinev liikumiskiirus elektriväljas, mis sõltub summaarsest laengust (viimane omakorda sõltub lahusti pH-st ja ioontugevusest), välise elektrivälja tugevusest, komponendi kujust, keskkonna viskoossusest jt. Biomolekulide (valgud, ensüümid jt.) elektrokineetiliste omaduste iseloomustamiseks kasutatakse elektroforeetilise liikumise suurust (EL):

$$EL = \frac{d}{x \cdot t}, \quad \text{kus}$$

EL - elektroforeetiline liikuvus ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$)

d - komponendi liikumise tee, cm

x - potentsiaali langus, V/cm

t - elektroforeesi aeg, sek.

Sõltuvalt elektroforeesi läbiviimise tehnikast, eristatakse järgmisi alaliike.

3.1. Vaba (frontaalne) elektroforees. Antud meetodi puhul liiguvad lahutatavad ioonsed komponendid lahuses vabalt U-kujulistest torukestes. Kuna puudub tahke kandja, pole võimalik teostada väikeste kergesti difundeeruvate molekulide (näit. aminohapped) frontaalset elektroforeesi.

3.2. Tsonaalne elektroforees tahkel kandjal. See on enamkasutatav elektroforeetiline meetod, mille puhul lahutatavate osakeste liikumine toimub kitsaste tsoonidena mingil tahkel

kandjal. Teatud aja möödudes jaotuvad erineva liikuvusega osakesed tsoonidesse, kust neid saab identifitseerida kas elueerides või värvides. Sõltuvalt kandjast (paber, agar-agar, polüakrüülamiidgeel jt.) saame rääkida paberelektroforeesist, geelelektroforeesist jne. Geelidel on teiste kandjate suhtes olulisi eeliseid. Näiteks tingib geeli poorne struktuur lahuse suure "vaba mahu", mis kindlustab elektroforeesi suure kiiruse. Polüakrüülamiidgeel tagab ka paberiga võrreldes mitmeid kordi suurema lahutuvuse. Kuigi agargeelil on väiksem lahutusvõime kui polüakrüülamiidgeelil (või tärglisegeelil), leiab agargeel temas toimuva-kiire difusiooni tõttu, aga ka läbipaistvusest tingituna, tihti kasutamist valkude elektroforeesil, eriti aga immunoelektroforeesil. Viimase olemus seisneb selles, et valgukomponentide identifitseerimiseks elektroforegrammil kasutatakse antikeha-antigeen reaktsiooni (pretsipitatsioonireaktsiooni).

3.3. Isoelektriline fokuseerimine. Komponente lahutatakse pH-gradiendi abil kolonnis või plaadil nende erineva pI alusel. pH gradient luuakse spetsiifiliste amfoteersete ainete amfoliinide abil. Iga komponent liigub elektriväljas pH-gradiendis selle kohani, kus pH väärtus ühtub selle komponendi pI väärtusega (kaob elektriline laeng), st. komponendid jagunevad tsoonidesse nende pI väärtuste alusel.

3.4. Isotahhforees. Komponentide lahutamine toimub puhvri pidevas voolas nende liikuvuse alusel polüakrüülamiidgeelis. Uuritav proov viiakse kahe puhvri piirimaile, mistõttu erinevad komponendid paigutuvad järjestikku vastavalt nende elektroforeetilisele liikuvusele. Järgnevalt liiguvad komponendid ühtlase kiirusega elueerimiskambris, millest nad elueeritakse puhvri pideva vooluga.

4. Ultratsentrifuugimine. Meetod makromolekulide molekulmassi määramiseks ja erineva molekulmassiga molekulide lahutamiseks sedimentatsioonil tsentrifugaaljõu toimele. Tugeva tsentrifugaaljõu saamiseks on konstrueeritud ultratsentrifuugid, kus rootor, pööreldes vaakumis, saavutab kiiruse kuni 80 000 pöör/minutis ja arendab tsentrifugaaljõudu (väljendatakse g-des), mis kuni 600000 korda ületab maa külgetõmbejõu.

Analüütilised ultratsentrifuugid, mis on varustatud optilise süsteemiga makromolekulide sedimentatsiooni jälgimiseks, võimaldavad määrata valkude, ensüümide, nukleinhapete jt. molekulmassi. Selleks on kasutusel 2 meetodit:

1. Molekulmassi määramine sedimentatsioonikiiruse järgi.

Makromolekulide lahuses moodustub tsentrifugaaljõu toimel tsentrifuugi küvetis piir lahusti ja sedimenteeruvate molekulide vahel. Selle piiri liikumist ajas on võimalik optiliselt registreerida ja selle järgi arvutada sedimentatsioonikiirust, mis on molekulmassi funktsiooniks. Ultratsentrifuugis määratakse vahetult sedimentatsioonikoefitsient s

$$s = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 x} = \frac{M_r(1 - \bar{v}\rho_1)}{f}, \text{ kus}$$

s - sedimentatsioonikoefitsient, omab ajalist mõõtu; ühikuks on svedberg (S) $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$

$\frac{dx}{dt}$ - sedimentatsioonikiirus

ω - pöörlemise nurkkiirus, radiaan/s

x - komponendi kaugus pöörlemisteljest, cm

M_r - molekulmass

\bar{v} - komponendi partsiaalne erimaht, l/kg

ρ_1 - lahusti tihedus

f - hõõrdumise molaarne koefitsient

Lahendades võrrandi M_r suhtes, saame $M_r = \frac{fs}{1 - \bar{v}\rho_1}$

Kuna f ei ole teada ja on väga raskesti määratav, siis väljendatakse teda difusioonikoefitsiendi (D) kaudu:

$$f = \frac{RT}{D}, \text{ kus } R - \text{gaasikonstant}$$

T - absoluutne temperatuur

$$\text{Sel juhul } M_r = \frac{sRT}{D(1 - \bar{v}\rho_1)}$$

Kõik parameetrid on eksperimentaalselt määratavad.

2. Molekulmassi määramine sedimentatsioonitasakaalu järgi.

Kuna difusioonikoefitsiendi (D) määramine on töömahukas, kasutatakse molekulmassi määramiseks ultratsentrifuugimisel sellist tsentrifugaaljõudu, mis on täsakaalus difusiooniga

ja võimaldab M_r arvutamisel välja jätta D ja määrata optiliselt registreerimisel komponendi kontsentratsioon (c) kaugusel x pöörlemisteljest. Sel juhul:

$$M_r = \frac{2RT \ln c}{\omega^2 x^2 (1 - \bar{v}_p)}$$

Teisendades võrrandit, võime kirjutada:

$$\ln c = \frac{M_r (1 - \bar{v}_p) \omega^2 x^2}{2RT}$$

Molekulmass leitakse graafiliselt $\ln c$ sõltuvusest x^2 -st. Saadakse sirge, mille tõusunurk võrdub:

$$\frac{M_r (1 - \bar{v}_p) \omega^2}{2RT},$$

mis võimaldab M_r arvutamist.

Preparatiivsed ultratsentrifuugid võimaldavad erineva molekulmassiga (tihedusega) komponentide lahutamist nende sedimentatsioonikiiruse järgi. Biokeemias kasutatakse preparatiivseid ultratsentrifuuge sageli raku subtsellulaarsete fraktsioonide ja supramolekulaarsete komplekside lahutamiseks kahel printsibil.

1. Diferentsiaaltsentrifuugimisel on lahutamise aluseks komponentide erinev sedimentatsioonikiirus ja neid saab lahutada, rakendades järkjärguliselt erinevat tsentrifugaaljõudu. Eelnevalt on vajalik rakud purustada homogeniseerimise, osmootse šoki jt. meetodite abil. Näiteks sedimenteeruvad tuumad homogenaadist 600 g juures 10 min jooksul, mitokondrid 15000 g juures 5 min jooksul, mikrosoomid (ribosoomid koos endoplasmaatilise retiikulumi tükikestega) 100 000 g juures 60 min jooksul jne.

2. Tsentrifuugimine tihedusgradiendis. Kasutatakse tavaliselt sahharoosi tihedusgradienti, milles komponendid tsentrifuugimisel jaotuvad tsoonidena vastavalt oma tihedusele. Saab määrata ka komponendi ligikaudset M_r .

Sahharoosi
molaarsus
(20°C)

0,37

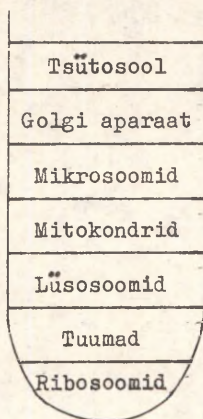
0,74

1,12

1,50

1,89

2,29



Sahharoosi
tihedus (mg/ml)
(0°C)

1,05

1,10

1,15

1,20

1,25

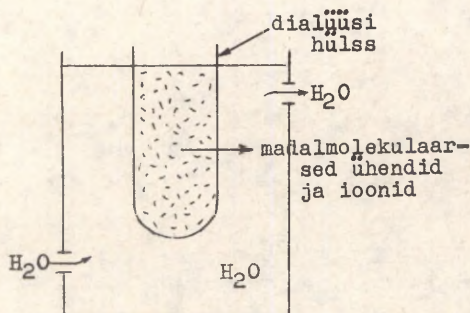
1,30

1,59

Joon. 2. Subtsellulaarsete fraksioonide jaotus
sahharoosi tihedusgradiendis

III Makromolekulide kontsentreerimise ja täiendava puhastamise meetodid.

1. Dialüüs. Paljud makromolekulid vajavad lahustumiseks teatud ioontugevusega keskkonda, mille kindlustab elektro-
lüütide (ioonide) või teiste madalmolekulaarsete ainete ma-
nulus. Dialüüs põhineb poolläbilaskvate kilede (membraanide)



Joon. 3. Dialüüsi skeem

kasutamisel, mis on
lõbitavad madalmoleku-
laarsetele ühenditele,
mitte aga makromoleku-
lile. Kui makromole-
kulide segu asetada
poolläbilaskvast ki-
lest valmistatud dia-
lüüsihülssi, viimane
omakorda puhtasse vet-
te, siis makromoleku-
lide lahus puhastub
difusiooni abil väikes-
test molekulidest ja

ioonidest, väheneb ioontugevus ja makromolekulid, vastavalt oma lahustuvusele teatud ioontugevuse juures, sadenevad välja. Dialüüsil on vajalik hülssi ümbritseva vee pidev vahetamine, tagamaks ionide ja madalmolekulaarsete ainete võimalikult efektiivse elimineerimise.

2. Kristalliseerimine on mingi aine eraldumine lahusest kristallidena lahuse üleküllastamisel või jahutamisel, kusjuures lahusesse jäävad ballastained. Aine puhtust tõstab veelgi korduv kristalliseerimine.

3. Lüofiliseerimine on aine kontsentreerimine lahusti eraldamise teel. Makromolekulide lahuste lüofiliseerimist teostatakse tavaliselt madalal temperatuuril vaakumi tekitamisega.

4. Ultrafiltratsioon. Spetsiaalse filtreerimisnõu põhjas olevast membraanist (nn. molekulaarne filter) lähevad rõhu all läbi vaid teatud suurusega molekulid, mistõttu membraanile jääv makromolekulide lahus kontsentreerub.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 2

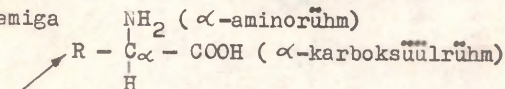
Teema nr. 1. AMINOHAPETE JA VALKUDE KVALITATIIVNE JA KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE.

Teadmiste algtase:

1. Aminohapete, peptiidide ja valkude üldmõisted.
2. Aminohapete optiline aktiivsus ja isomeeria (L- ja D-isomeerid, diastereoisomeerid).
3. Spektraalanalüüs: neeldumisspekter, neeldumismaksimum.
4. Biokeemias enamkasutatavad füüsikalised-keemilised meetodid.

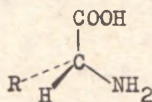
Üldmõisted. Aminohapped (AH) on orgaaniliste hapete (karboksüülhapete) aminoderivaadid, mis sisaldavad vähemalt üht aminorühma ja üht karboksüülrühma. Aminorühma paigutus karboksüülrühma suhtes (kas $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$ jne. küljes) liigendab aminohapped α -, β - jne. AH-teks.

Enamik eluslooduses avastatud AH-test (üle 100) on α -AH-d üldvalemiga

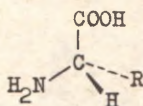


↑
Igale aminohappele spetsiifiline radikaal

Stereoisomeeria. Tingituna sellest, et AH-te α -süsi-
nik on asümmeetriline (v.a. glütsiin), esinevad nad stereo-
isomeeridena, mis struktuurselt vastavad glütseeraldehüüdi
stereoisomeeridele (vt. monosahhariidide stereoisomeeria) ja
tähistatakse sümbolitega D- ja L-.



D-AH





L-AH

Looduses ja valkude koostises esinevad põhiliselt L-ami-
nohapped. D-AH-d esineb mikroobides ja antibiootikumides.

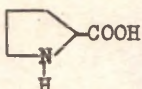
AH-te stereoisomeerid on optiliselt aktiivsed, pöörates
polarisatsiooni tasapinda kas paremale (+) või vasakule (-).
Pööramise suund sõltub konkreetsest AH-e struktuurist ja ei
ole seotud D- või L-isomeeriaga.

Looduslikes valkudes on leitud 20 erinevat AH-t (prote-
inogeensed e. põhi-AH-d). Nende levinuim klassifikatsioon
lähtub radikaali R keemilisest loomusest ja füüsikalis-kee-
mistest omadustest füsioloogilise pH (7,4) juures. Eris-
tatakse nelja AH-te rühma.

1. Neutraalsed hüdrofoobsed (apolaarsed) AH-d (R ei dissot-
sieeru.

AH	R	Sümbol
Glütsiin	H-	Gly
Alaniin	H ₃ C-	Ala
Valiin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \text{CH}-$	Val
Leutsiin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} \text{CH-CH}_2-$	Leu
Isoleutsiin	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C-CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Ile
Metioniin	H ₃ C-S-CH ₂ -CH ₂ -	Met
Fenüülalaniin	 -CH ₂ -	Phe
Trüptofaan	 -CH ₂ -	Trp

Proliin *



Pro

2. Neutraalsed hüdrofiilsed (polaarsed) AH-d (R on valdavalt laenguta).

Seriin $\text{HO}-\text{CH}_2-$ Ser

Treoniin $\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-$ Thr

Türosiin $\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$ Tyr

Tsüsteiin $\text{HS}-\text{CH}_2-$ Cys

Asparagiin $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-$ Asn

Glutamiin $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ Gln

3. Happelised hüdrofiilsed (polaarsed) AH-d (R loovutab H^+ ja laadub negatiivselt).

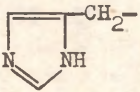
Asparagiinhape $\text{HO}-\underset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-$ Asp

Glutamiinhape $\text{HO}-\underset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ Glu

4. Aluselised hüdrofiilsed (polaarsed) AH-d (R liidab H^+ ja laadub positiivselt).

Lüsiin $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-$ Lys

Arginiin $\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{NH}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\underset{\text{H}}{\underset{|}{\text{N}}}-(\text{CH}_2)_3-$ Arg

Histidiin  His

* Proliini (on antud täielik valem) käsitatakse iminohapena

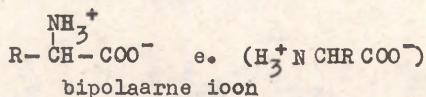
AH klassifitseeritakse ka bioloogilise (füsioloogilise) tähtsuse alusel: a) asendamatud AH (organism peab neid kindlasti saama toiduga). Absoluutselt asendamatud on kõigi loomorganismide jaoks 8 AH (Val, Leu, Ile, Met, Thr, Lys, Phe, Trp). Igale organismi liigile iseloomulik asendamatute AH-te koosseis, nn. auksotroofsus AH-te suhtes peegeldab selle liigi organismide omapära; b) osaliselt asendamatud AH (moodustuvad organismis mittepiisavalt, mistõttu peab osaliselt saama toiduga), mis inimese puhul on Arg, Tyr, His; c) asendatavad AH (sünteesitakse organismis piisavalt) ehk kõik ülejäänud AH.

AH puhul eristatakse ka teatud rühmitusi nagu aromaatsed AH (Phe, Tyr, Trp), vaavlitisisaldavad AH (Cys, Met, Cys-Cys), hüdoksüaminohapped (Ser, Thr).

Lisaks ülalnimetatud AH-le esineb spetsiifilise funktsiooniga valkudes (näit. kollageenis) harvaesinevaid AH, mis kujutavad endast 20 põhiaminohappe derivaate (näit. 4-hüdrosü- ja 5-hüdrosüproliin - Hyp; hüdrosülüsiin - Hyl jt.).

Lahustuvus. Üldiselt lahustuvad AH-d vees hästi, halvem on seal hüdfoobsete radikaalidega AH-te lahustuvus. Tunduvalt halvem on AH-te lahustuvus apolaarsetes lahustites (etanool, dietüüleeter, metanool jt.).

Dissotsiatsioon. AH-d on vesilahuses nii happelised (ioniseeruva $-COOH$ tõttu) kui ka aluselised (ioniseeruva $-NH_2$ tõttu) elektrolüüdid, st. amfolüüdid. Nii vesilahuses kui ka kristallilisel kujul esinevad neutraalsed AH-d sisseoolade e. bipolaarsete ionide (tsvitterioon, amfioon) vormis.



AH-te dissotsieerumise määrab keskkonna pH. Tugevalt happelises keskkonnas on AH-d katioonses vormis ($H_3^+N CHR COOH$), tugevalt leeliselises keskkonnas aga anioonses vormis ($H_2N CHR -COO^-$). Vahepealses pH vahemikus (3,5-9) on AH-d põhiliselt amfioonises vormis, sealjuures teatud pH väärtuse juures (seda nim. selle AH-e isoelektriliseks täpiks; pI) on AH ainult amfioonses vormis. pI juures AH-d elektriväljas ei liigu ning omavad vähimat lahustuvust vees, kuna amfioonsus

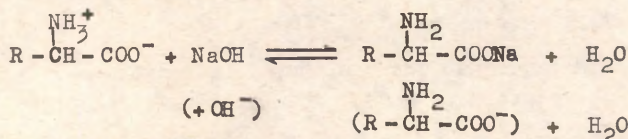
vähendab -NH_2 ja -COOH hüdrofiilsust. Vastava ΔH -e pI leitakse tiitrimiskõvera abil.

Neeldumisspekter. Proteinogeensetest ΔH -test omavad olulist neeldumismaksimumi vaid Trp, Tyr (280 nm) ja Phe (260 nm).

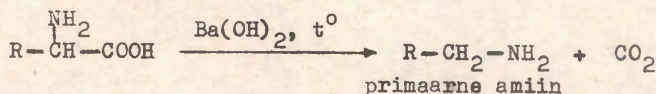
ΔH -te põhilised keemilised reaktsioonid.

1. R-COOH reaktsioonid

1.1. Soolade teke alustega reageerimisel (reaktsiooni aluseks on ΔH -te amfoteersus)



1.2. Dekarboksüülimine



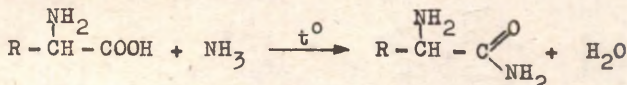
Elusorganismides toimub see reaktsioon ΔH -te dekarboksülaaside toimel ning tekivad biogeensed amiinid.

1.3. Estri teke

Mineraalhapestega (vt. reaktsioon 2.1.) moodustub hüdrokloriidaminohape, mis annab alkoholiga estri. Viimast saab erinevalt vabast ΔH -st gaaskromatograafiliselt destilleerida.



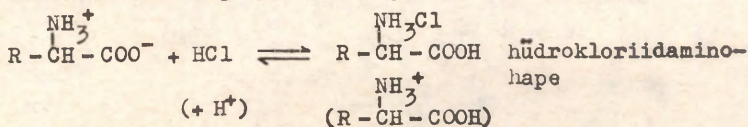
1.4. Amiidide teke



ATP energia baasil toimub loomorganismides nii glutamiini (Gln) süntees glutamiinhapest (Glu) glutamiini süntetaasi toimel.

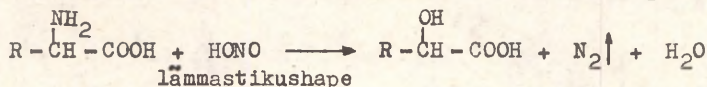
2. R-NH₂ reaktsioonid

2.1. Soolade teke reageerimisel hapetega (näit. HCl)

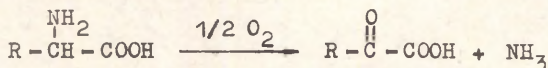


2.2. Desamiinimine

a) Väljaspool organismi on rekatsioon teostatav lämmastikus-
happe (HNO_2) toimel (Van Slyke'i reaktsioon) ja teda kasuta-
takse AH-te kvantitatiivseks määramiseks (eralduva N_2 järgi).



b) Oksüdeeriv desamiinimine



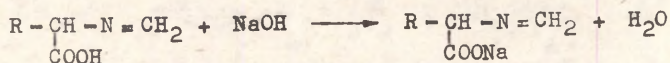
AH-te metabolismis toimub see glutamaadi dehüdrogenaasi
($\text{Glu} \longrightarrow \alpha\text{-ketoglutarat} + \text{NH}_3$) ja aminohapete oksüdaa-
side osavõtul.

2.3. Reaktsioon aldehüdiga (formooltiitrimine Sørenseni järgi)

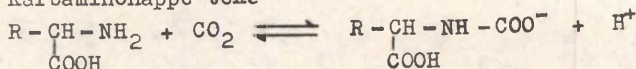
Blokeerides formaldehüdiga AH-te $\alpha\text{-NH}_2$, saab karbok-
suülrühma tiitrida NaOH-ga. Formooltiitrimist kasutatakse
vabade AH-te kvantitatiivseks määramiseks ja valgu hüdrolüü-
sil vabanenud AH-te avastamiseks.



metüleenaaminohape
(Schiffi alus, aldimiin)



2.4. Karbamiinhapete teke



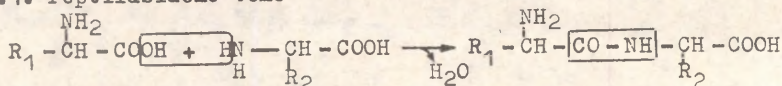
Sellisel viisil seotakse globiini külge (Arg või Lys -NH_2
kaudu) ka hemoglobiini poolt transporditav CO_2 .

2.5. Sangeri reaktsioon (vt. Teema nr. 2).

2.6. Edmani reaktsioon (vt. Teema nr. 2).

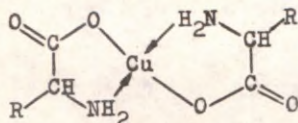
3. Reaktsioonid nii R-COOH kui ka R-NH_2 osavõtul

3.1. Peptiidsideme teke



3.2. Kelaatühendite teke

AH-d annavad kahevalentsete metallidega kelaatühendeid, mis on olulised ensüümvalgu ja mõnede koensüümide seostumises.



Kokkuvõtte: AH-te füsikokeemilised omadused on aluseks AH-te lahutamisele, identifitseerimisele ja kvantitatiivsele määramisele.

AH kvalitatiivne määramine

1. Varvusreaktsioonid

1.1. Üldised, universaalsed värvusreaktsioonid α -AH-te olemasolu määramiseks uuritavas segus.

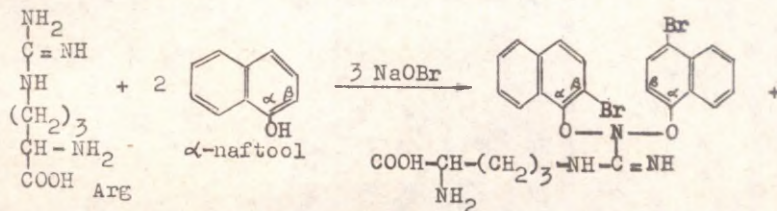
a) Ninhüdriniireaktsioon. α -NH₂ ja ninhüdrini vahelises reaktsioonis tekib sinakasvioletne kompleksühend (Ruhemani kompleks). Vabast α -COOH-st eraldub reaktsiooni käigus CO₂ (ninhüdrini ja vaba NH₂ reaktsioonis CO₂ ei eraldu).

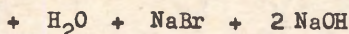
Ninhüdrini muu lahuse kasutamisel tekivad Schiffi alus ei lõhustu (ühendis puudub vesi). Seetõttu tekivad erinevate AH-te kondenseerumisel ninhüdriniga mitmevärvilised (sinine, punane, violetne) kompleksid. Kui lahuses esineb ainult Pro, tekib kollase värvusega kompleks.

Ninhüdriniireaktsiooni (ninhüdrini alkohol- või atsetoonlahusega) kasutatakse väga laialdaselt AH-te ilmutamiseks nende kromatograafilisel lahutamisel.

1.2. Spetsiifilised värvusreaktsioonid konkreetse vaba AH-e määramiseks uuritavas segus või vastava AH-e olemasolu kindlakstegemiseks uuritavas valgus.

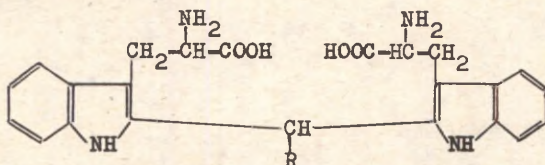
a) Sakaguchi reaktsioon arginiinile. Arg guanidiinrühm oksüdeerub spetsiifiliselt leeliselises keskkonnas α -naftooliga Na-hüprobromiti juuresolekul roosakaspunaseks kondensatsiooniproduktiks:





Reaktsiooni annab valgus seotud (lahjenduses kuni 1:50 000) ja vaba Arg (lahjenduses kuni 1:100 000).

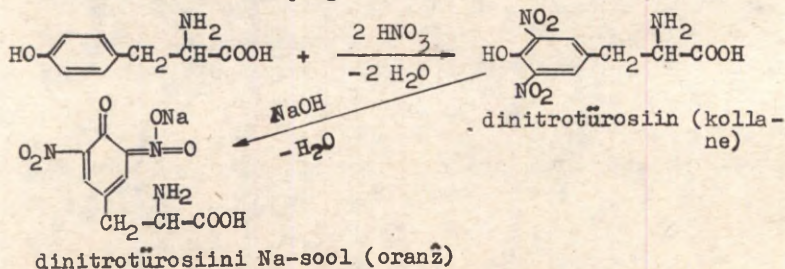
b) Reaktsioonid trüptofaanile. Trp reageerib happelises keskkonnas paljude aldehüüdidega, andes värvilisi kondensaat-
te üldstruktuuriga:



- Hopkins-Cole'i reaktsioon trüptofaanile. Reaktsiooni annavad nii vaba kui ka valgus seotud Trp. Glüoksüülhappe ($\text{HOOC}-\text{C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{smallmatrix}$; Hopkins-Cole'i reaktiiv) kondensatsiooniprodukt Trp-ga on punakasvioletse värvusega. Reaktsiooni nimetatakse ka Adamkevitsi reaktsiooniks.

- Ehrlichi reaktsioon trüptofaanile. Trp-i ja aromaatsede aldehüüdi (näit. p-dimetüülaminobensaldehüüdi) reageerimisel H_2SO_4 juuresolekul tekib tugev punakasvioletne värvus. Reaktsioon on tüüpiline vabale Trp-le, kuid et ta rajaneb indool-tuumale, segavad teda teised antud tuuma sisaldavad ühendid.

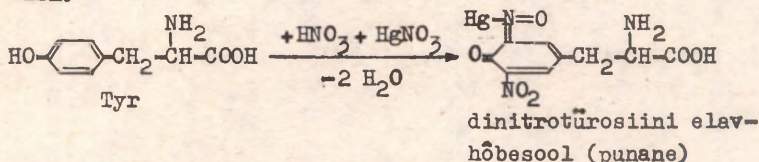
c) Ksantoproteiinireaktsioon (Mulderi reaktsioon) aromaatsetele AH-le (Trp, Tyr, Phe). Reaktsiooni annavad nii valgus seotud kui ka vabad AH-d, mis sisaldavad fenüül-, p-hüdroksü-fenüül- või indolüülradikaali. Kontsentreeritud HNO_3 toimel tekivad kollased nitreeritud aromaatsete tuumadega ühendid ($\chi\alpha\nu\tau\omicron\varsigma$ - kollane), mis leeliselise keskkonna loomisel annavad oranži värvuse (tekivad kinoidse struktuuriga soolad). Reaktsiooni kemism on järgmine:



Analoogiline reaktsioon (kollase värvuse teke) toimub

ka kontsentreeritud HNO_3 sattumisel nahale, küüntele jne. Kuna reaktsioon on spetsiifiline aromaatsetele AH-le, segavad teda ülalnimetatud tuumi sisaldavad ühendid (fenool, benseen, salitsüülhape jt.).

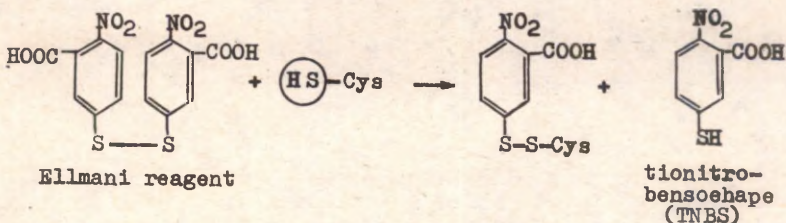
d) Milloni reaktsioon türosiinile. Tyr reageerimisel Milloni reaktiiviga (Hg -nitraatide ja -nitritite segu konts. HNO_3 -s) moodustub keetmisel veripunane sade. Reaktsiooni kemism:



Reaktsioon baseerub hüdroksüfenüülradikaalile, mistõttu teda segavad fenool, salitsüülhape, naftoolid jt. Reaktsiooni annavad nii valgus seotud kui ka vaba Tyr.

e) Diasoreaktsioon türosiinile ja histidiinile. Diasoreaktiivide segu toimel annavad nii valgus olev kui ka vaba Tyr ning His vastavalt kollakaspunase ja kirsipunase värvuse. Reaktsiooni segab Trp.

f) Ellmani reaktsioon tsüsteiinile. Nii vaba kui ka valgus seotud Cys reageerimisel leeliselises keskkonnas Ellmani reagentiga - 5,5-ditiobis(2-nitrobensoehappega) eraldub kollase värvusega tionitrobensoehape, mille olemasolu saab määrata 412 nm juures. Reaktsiooni kemism:



g) Reaktsioon tsüsteiinile ja tsüstiinile. Kuumutamisel konts. KOH- või NaOH-lahusega toimub valkude hüdroolüüs ning Cys või Cys-Cys väävel vabaneb sulfiidina (Na_2S), mille olemasolu tõestatakse musta PbS sademe tekkega.

2. Kromatograafia

Uuritavas segus on AH-eid võimalik identifitseerida nende kromatograafilise jaotumise või liikumise võrdlemisel

test-AH-te vastavate parameetritega. Põhimõtteliselt on kasutatavad kõik kromatograafilised meetodid (vt. praktikum 1), enamkasutatavateks on kromatograafia tahkel kandjal ning gaaskromatograafia.

AH-te kvantitatiivne määramine

1. Värvusreaktsioonid

1.1. Üldistest värvusreaktsioonidest AH-te üldhulga määramiseks uuritavas segus on enamkasutatav ninhüdriniireaktsioon, mille käigus tekkiva sinakasvioletse värvuse intensiivsus, mõõdetuna 570 nm juures (neeldumismaksimum), annab α -AH-te üldhulga uuritavas lahuses. (NB! Kui lahuses on ainult Pro või Hyp, on tekkiva värvuse neeldumismaksimum 440 nm juures).

1.2. Spetsiifilised värvusreaktsioonid. Kõiki kvalitatiivse määramise juures nimetatud spetsiifilisi värvusreaktsioone saab põhimõtteliselt kasutada ka vastavate konkreetsete AH-te kvantitatiivseks määramiseks tekkiva värvuse intensiivsuse mõõtmise kaudu. Praktikast leiavad kasutamist siiski ainult Ehrlichi reaktsioon trüptofaanile, Sakaguchi reaktsioon arginiinile ja Ellmani reaktsioon tsüsteiinile. Teised reaktsioonid pole piisavalt spetsiifilised.

2. Neeldumisspektrite meetod

Et Tyr ja Trp omavad selgelt väljendunud neeldumismaksimumi (275-280 nm), saab sellel lainepikkusel nende hulka määrata nii seotuna valgus kui ka vabas olekus.

3. Kromatograafia

Uuritava AH-te segu lahutamisel saadud kromatogrammi alusel on võimalik leida ka vastavate AH-te hulki. Nii näiteks pestakse kromatogrammilt lahutunud AH-d välja ning, võttes arvesse pealekantud lahuse hulka, võib leida antud AH-e hulga lähtelahuses. AH-te hulka võib leida ka antud AH-e piigi pindala järgi kromatogrammil, arvestades kõikide AH-te piikide kogupindala.

4. Mikrobioloogilised meetodid põhinevad mikroobide selliste mutantide kasutamisel, millel puudub võime sünteesida määratavat AH-t. Registreerides nende mikroobide kasvukiiruse muutust uuritava segu lisamisel söötlele (mikroobide suspensiooni tiheduse suurenemise järgi; laktobatsillide puhul tekkiva piimhappe hulga järgi jne.), saame leida antud AH-e si-

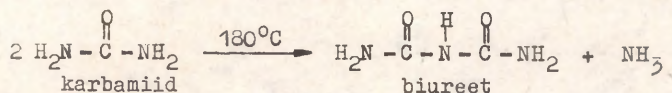
salduse uuritavas segus, sest mikroobide kasvukiirus on otseselt sõltuvuses selle AH-e sisaldusest keskkonnas.

Valkude kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine

1. Värvusreaktsioonid

1.1. Üldised värvusreaktsioonid võimaldavad määrata valgu olemasolu ja hulka lahuses.

a) Biureedireaktsioon. Ühendid, mis sisaldavad peptiidliidet, annavad aluselises keskkonnas CuSO_4 toimel punakasvioletse värvuse*. Reaktsiooni nimetus tuleneb sellest, et analoogilise värvuse annab ka biureet, mis tekib karbamiidi kuumutamisel tema kahe molekuli ühinemisel.



Biureedireaktsiooni kasutatakse sageli valkude kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks. Seejuures tuleb aga arvestada, et reaktsioon pole absoluutse spetsiifilisusega, sest samasuguse värvuse annavad ka mõningad mittepeptiidid ($-\text{CH}-\text{NH}-$; $=\text{C}-\text{NH}-$; $-\text{C}=\text{C}-$) ning mõningate AH-te (His, Ser, Thr, Asp) väga nõrgad kontsentratsioonid. b) Ninhüdrinireaktsioon. Tänu vabadele aminorühmadele (N-terminaalne $\alpha\text{-NH}_2$, Arg-i ja Lys-i vabad -NH_2 rühmad) annavad valgud ja peptiidid positiivse ninhüdrinireaktsiooni, mida kasutatakse valkude kvalitatiivseks määramiseks.

1.2. Spetsiifiliste värvusreaktsioonide kasutamine valkude määramiseks on suhteline järgmistel põhjustel: 1) kõik AH-te määramise juures kirjeldatud värvusreaktsioonid baseeruvad vastava (vastavate) AH-te sisaldusele või vastavate AH-te vahetevahelisele (või järjestusele) uuritavas valgus; 2) ükski värvusreaktsioon ei võimalda valkude segus määrata individuaalset valku, v.a. juhul, kui on tegemist individuaalse valgu lahusega.

Enamkasutatavateks valkude kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks on järgmised meetodid.

* Värvuse iseloom sõltub peptiidi pikkusest: dipeptiid - sine, tripeptiid - violetne, tetrapeptiid - punane. Alates pentapeptiidist on värvus punakasvioletne.

a) Lowry meetod. Lowry jt. meetod (või selle teatud modifikatsioonid) on senini kõige kasutatavamaks ja tundlikumaks meetodiks valkude kvantitatiivsel määramisel lahuses. Meetod baseerub asjaolul, et fenoolse reagendi (Folin-Ciocalteu reaktiiv) toimel tekib leeliselises keskkonnas intensiivne sinine värvus (mõõdetakse 680-750 nm juures). Värvuse tekke aluseks on nii peptiidsidemete kui ka aromaatsete AH-te olemasolu ja nende teatud järjestus uuritavas objektis. Meetodi rakendamisel tuleb arvestada, et teatud värvuse annavad ka lahuses olevad vabad AH-d.

b) Reaktsioon Ellmani reaktiiviga. Kui uuritav valk sisaldab rohkesti Cys, saab tema ligikaudset hulka määrata Ellmani reagendi abil.

2. Neeldumisspektrite meetod

Kuna enamikes valkudes on rohkesti Tyr ja Trp, saab nendele AH-le omase neeldumismaksimumi juures (275-280 nm) määrata valgu hulka uuritavas proovis. Kuigi meetod on suhteliselt ebatäpne (teda segavad näiteks nukleotiidid), leiab ta rakendamist massanalüüsides.

3. Elektroforees.

Testvalkude ja uuritavate valkude elektroforeetilise liikuvuse võrdlemise kaudu saab kindlaks teha, millised valgud esinevad uuritavas proovis. Elektroforeogrammide vastav analüüs (densitomeetria) võimaldab leida valkude hulga.

4. Immunoloogilised meetodid

Individaalse valgu määramise aluseks on tema kõrge bioloogiline spetsiifilisus. Valgu kui antigeeni reageerimine talle vastava antikehaga tõestab antud valgu olemasolu uuritavas segus, antigeeni ja antikeha reaktsioonil tekkiva sademe hulga järgi saab leida antud valgu hulka.

5. Teisi meetodeid

a) Kjeldahli meetod. Kuna lämmastiku hulk valkudes on üsna püsiv suurus (keskmiselt 16%), siis valgus määratud N hulga järgi võib arvutada valgu hulka. Kjeldahli meetodit kasutatakse tänapäeval reeglina teiste meetoditega saadud tulemuste kontrolliks.

b) Keeduproov. Valku sisaldava lahuse lühiajalisel keetmisel tekib valkjäs sade, mis tõestab valgu olemasolu.

Teadmiste kontroll

1. Kirjutage α -AH-te ja γ -AH-te üldvalem.
2. Kuidas klassifitseeritakse α -AH-id?
3. Nimetage ja kirjutage AH-te põhilised keemilised reaktsioonid.
4. Andke AH-te kvalitatiivse ja kvantitatiivse määramise meetodid ja nende põhiprintsiibid.
5. Loetlege valkude tähtsamad kvantitatiivse määramise meetodid ja selgitage nende olemust.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коронкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, стр. 10-41.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, стр. 26-35.
3. Loengute konspekt.

Teema nr. 2. VALKUDE STRUKTUUR JA FÜSIKOKEEMILISED OMADUSED

Teadmiste algtase

1. AH-te füsikokeemilised omadused
2. AH-te ja valkude kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine
3. Peptiidside, peptiidid. Peptiidide nomenklatuur. N- ja C-terminaalsed AH-d. Peptiidide omadused
4. Valgud kui hüdrofiilsed kolloidid

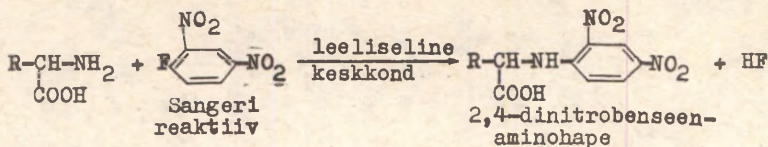
Üldmõisted. Erinevate omaduste ja funktsioonidega valkude ning peptiidide olemasolu looduses on tingitud erinevustest nende AH-lises koostises ja ka AH-te järjestuses (primaarstruktuuris). Kuna geneetiliselt determineeritud antud valgu primaarstruktuur määrab ära tema kõrgemat järku struktuuritasemed, siis on primaarstruktuuri määramine olulise informatiivsusega. Primaarstruktuuri kindlakstegemise üldskeem oleks järgmine:

I Individuaalse valgu (peptiidi) isoleerimine.

II Terminaalsete (otsmiste) AH-te määramine (viimaste arv näitab ahelate arvu valgu molekulis).

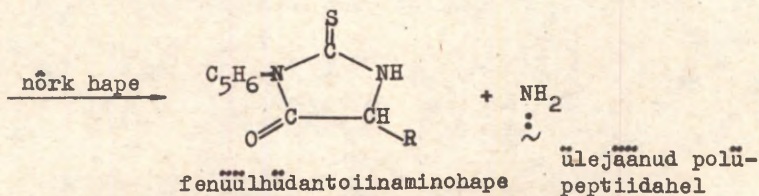
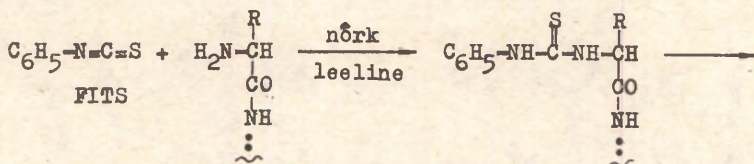
1. N-terminaalsete AH-te määramise meetodid

a) Sangeri meetod. Sangeri reaktiiviga (2,4-dinitrofluorobenseen, DNFB) "märgistatakse" N-terminaalne AH:



Järgnevalt valk (peptiid) lõhutakse happelise hüdroolüüsiga. Võrreldes uuritava AH kromatograafilist liikuvust Sangeri reaktiiviga "märgistatud" test-AH-te omaga, identifitseeritakse N-terminaalne AH.

b) Edmani degradatsioonimeetod. N-terminaalne AH "märgistatakse" Edmani reaktiiviga (fenüülsotiotsüanaat, FITS), eraldatakse valgust (peptiidist) ja identifitseeritakse:



Järgnevalt võib märgistada järgmise N-terminaalse AH, selle eraldada ja identifitseerida. Spetsiaalse seadme (sekvenaatori) abil on õnnestunud N-terminaalsest polüpeptiidahela otsast, ahelat kahjustamata, määrata umbes 60 AH-t. Astmelisus ongi selle meetodi oluline eelis, võrrelduna Sangeri meetodiga.

c) Ensümaatiline meetod. Aminopeptidaaside lühiajalisel toimel eraldatakse N-terminaalne AH ja identifitseeritakse see kromatograafiliselt.

d) Dansüülkloriidi ja pipsüülkloriidi (p-joodfenüülsulfokloriid) meetodid. Esimesel juhul tekib dansüülmärgistatud N-terminaalne AH, mis identifitseeritakse fluorestsentsi järgi. Teisel juhul sisaldab N-terminaalne AH ^{131}I ja teda identifitseeritakse radioaktiivsuse alusel.

2. C-terminaalsete AH-te määramise meetodid

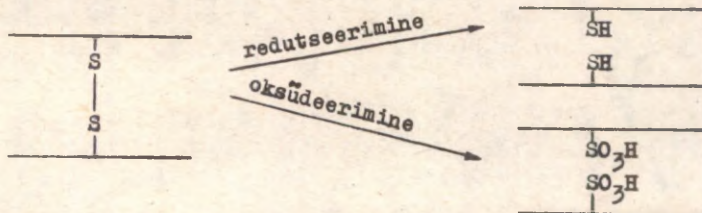
Kui vaba $\alpha\text{-NH}_2$ on uuritavas objektis modifitseeritud (näit. muna albumiinis on ta atsetüleeritud), tuleb määramist teostada C-terminaalsest otsast.

a) Ensümaatiline meetod. Karboksüpeptidaasidega eraldatakse vastav C-terminaalne AH, mis järgnevalt identifitseeritakse.

b) Akabori meetod (hüdrasiinolüüs). Uuritava polüpeptidaahela töötlemisel hüdrasiiniga lõhastatakse kõik peptiidsidemed ja vabanenud AH-test moodustuvad hüdrasiinderivaadid. Et C-terminaalse AH-e $\alpha\text{-COOH}$ ei osale peptiidsidemes, siis kõigist ahelas olevast AH-test ei teki ainult temast hüdrasiinderivaati, mis on tema identifitseerimise aluseks.

c) Redutseerimine boorhüdriidiga (NaBH_4 ja LiBH_4 jt.). Et vaba $\alpha\text{-COOH}$ redutseerub primaarseks alkoholirühmaks, siis hüdroolüüsiproductide hulgas on alati üks aminoalkohol, mis identifitseeritakse.

III Kui molekulis on mitu polüpeptidaahelat ja nad on seotud disulfiidsildade abil, siis ahelad eraldatakse nende sidemete lõhkumise abil:



IV Mitme polüpeptidaahela olemasolul molekulis määratakse nende identsus. Võrreldakse näiteks nende geelelektroforeetilist liikuvust detergendi (Na-dodetsüülsulfaat jt.) juuresolekul, osalise hüdroolüüsi productide kromatograafilist identsust jne.

V Osaline hüdroolüüs (happeline ja ensümaatiline)

Kasutatakse faktoreid, mis lõhuvad ahelat erinevatest kohtadest lühikesteks peptiidideks. Näiteks lõhub külm HCl peptiidsidemeid valikuta, trüpsiin põhiliselt Arg ja Lys $\alpha\text{-COOH}$ poolt moodustatud peptiidsidemeid, kumotrüpsiin peamiselt peptiidsidemeid, milles osaleb Phe, Tyr ja Trp $\alpha\text{-COOH}$.

Saadud lühikeste peptiidide AH-te järjestus määratakse Edmani, Sangeri, ensümaatiliste jt. meetodite abil. Kõrvutades erinevate hüdrolüüsifaktorite toimel saadud peptiidide kaarti, tekivad nn. kattuvad kohad, mille alusel saame kindlaks

_____	külm HCl
_____	trüpsiin
_____	kümotrüpsiin

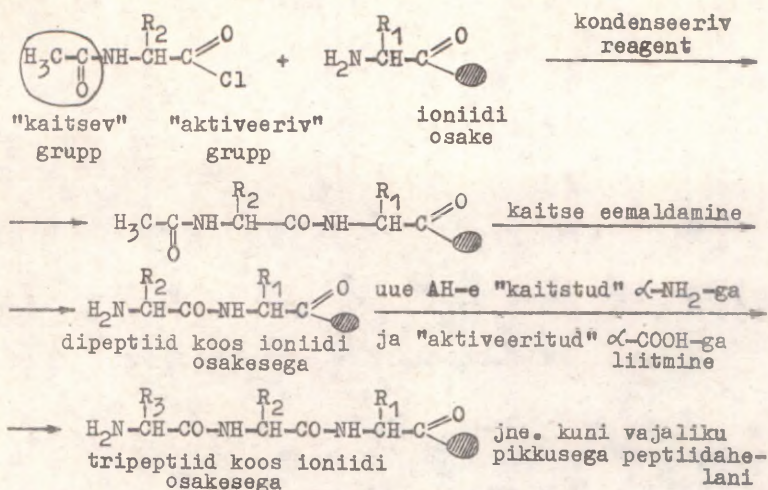
teha primaarstruktuuri.

VI Peptiidi (valgu) primaarstruktuuri lõplik tõestus tema tehniliku sünteesi kaudu

Sünteesil pole probleemiks mitte peptiidsideme kui sellise süntees, vaid sünteesi suunamine ja juhtimine nii, et peptiidsidemesse sisestuksid vajaliku AH-e α -NH₂ ja α -COOH rühm. Selleks kasutatakse kahte võtet - "aktivatsiooni" ja "kaitset". Aminorühma "kaitstakse" atsuülimisega, karboksüülrühma - ästerdamisega. Kaitavad faktorid peavad olema sellised, et nende hilisem eemaldamine jätkaks peptiidsideme terveks. Karboksüülrühma "aktiveeritakse" muundamisega klooranhüdriidiks kas tionüülkloriidi (SOCl₂) või fosfopentakloriidi (PCl₅) abil.

Kaasajal kasutatakse "kaitse" ja "aktivatsiooni" võtteid ioonvahetajal läbiviidaval tahkefaasilisel Merrifieldi sünteesil (joon. 4). Kuigi sel juhul on kasutusel automaatne Merrifieldi süntesaator, mis võimaldab teostada reaktsioone programmeeritud järjestuses ühes ja samas reaktsioonikambris, kuhu doseeritakse vastavate pumpadega vajalikke reaktiive, on süntees töömahukas ja pikaajaline, sest "kaitse" ja "aktivatsiooni" operatsioone peab kordama iga järgneva AH-e liitmisel. (Tahkefaasilise meetodiga sünteesiti ribonukleaas, mis koosneb 124 AH-järgist. Protsess koosnes 369-st keemilisest reaktsioonist ja 11931-st automaatsest staadiumist ja toimus ilma vaheühendite eemaldamiseta. Ühe peptiidsideme sünteesiks kulus ligikaudu 4 tundi).

C-terminaalne AH seotakse α -COOH abil ioonvahetaja külge ning temaga liidetakse "kaitstud" α -NH₂-ga AH, mille α -COOH on "aktiveeritud" PCl₅ või SOCl₂ abil.



Joon. 4. Valgu (peptiidi) tehisliku sünteesi üldskeem.

Peale sünteesi lõpetamist eemaldatakse peptiidahel ioonidilt reaktsioonidega, mis ei lõhu peptiidsidemeid.

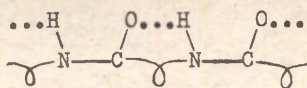
Kaasajaks on tehisliselt sünteesitud rida peptiide (valke), millest paljud on füsioloogiliselt aktiivsed ja kujutavad endast olulisi farmakopreparaate (näit. hüpofüüsi hormoonid - oksütotsiin (9 AH-t), vasopressiin (9 AH-t), AKTH (39 AH-t), pankrease hormoon insuliin (51 AH-t) jt.). Kaasajal teostatakse valkude ning bioaktiivsete peptiidide sünteesi insenerogeneetika ja biotehnoloogia meetoditega.

Tehisliselt on sünteesitud ka rida homopolüpeptiide (polüpeptiidahelad, mis moodustuvad ühe ja sama AH-e polükondensatsioonil, näit. polü-Ala). Nende süntees on lihtsam, kuna ta kulgeb peale initsieerimist spontaanselt. Ahela pikkuse määrab t^0 , lahusti ja reaktsiooni initsieeriija loomus. Kuigi homopolüpeptiide looduses pole, annab nende uurimine olulist informatsiooni peptiidide sekundaarstruktuuri ja füüsiko-keemiliste omaduste kohta.

Peale primaarstruktuuri eristatakse valkudel veel järgmisi struktuuritasemeid:

Sekundaarstruktuur - helitseerunud konformatsioon, mis fikseeritakse ruumis vesiniksidemete abil. Viimaste moodustumises on põhiline osa peptiidgrupil, kusjuures vesiniksides-

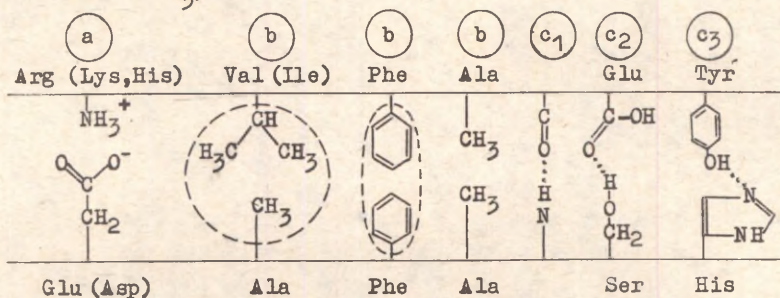
med moodustuvad kas ahelasiseselt (α -heeliksi puhul) või ahelate vaheliselt (β -konformatsiooni e. voltstruktuuri puhul).



(ühe keeru moodustavad 3,7 AH-e jääki)

Tertsiaarstruktuur - valgumolekuli kolmemõõtmeline ruumikujund, mis tekib polüpeptiidahela spetsiifilisel kokkukärgardumisel ning mille stabiliseerimisel on olulisimad järgmised nõrgad (mittekovalentsed) sidemed (joon. 5):

- 1) ioonsidemed (a), millede teke tuleneb vastasnimeliselt laetud gruppide elektrostaatilisest interaktsioonist. (-NH_3^+ ja -C(=O)O- vaheline ioonside on stabiilsem molekuli hüdrofoobses osas, sest vesi hüdratiseerib neid rühmi),
- 2) hüdrofoobsed vastastikused toimed (b) apolaarsete gruppide vahel (nn. van der Waalsi jõud), mis tekivad hüdrofoobsete rühmade teatud lähedusel elektronpilvede kattumise tõttu,
- 3) vesiniksidemed, mis tekivad peptiidgruppide vahel (c_1), happe ja alkoholigrupi vahel (c_2), fenoolse OH ja imidasoolgrupi vahel (c_3).



Joon. 5. Tertsiaarstruktuuri stabiliseerivad sidemed.

Peale nende sidemete osalevad valkude tertsiaarstruktuuri stabiliseerimisel ka fosfaatsillad e. fosfoestersidemed

($\text{-C(=O)-O-P(=O)(OH)-O-}$) ning disulfiidsidemed Cys-jääkide SH-gruppide vahel (-S-S-).

Kvaternaarstruktuur - valgu molekulis esinevate erinevate polüpeptiidahelate (subühikute) kindel vastastikune ruumiline paigutus. Seejuures on subühikud seotud nõrkade mittekovalentsete sidemetega ning kujutavad endast ühtset tervikut

struktuurses ja funktsionaalses mõttes.

Valgumolekuli sekundaar-, tertsiaar- ja kvaternaarstruktuuri (ruumilise struktuuri) tähistamiseks kasutatakse ka makrostruktuuri või konformatsiooni mõisteid.

Valkude kui kõrgmolekulaarsete ühendite lahused kuuluvad tõeliste lahuste hulka, kuid molekuli suured mõõtmised annavad nende lahustele kolloidlahuste omadused (molekulide väike difusioonikiirus, madal osmootne rõhk, nad ei läbi biomembraane ja hajutavad lahust läbivat valgust - Tyndalli efekt jt.). Valkude kolloidolekut stabiliseerivad

a) molekuli elektrilaengud, mis on tingitud valkude kui amfooterseste polüelektrolüütide molekulis olevatest ioniseeruvatest rühmadest

b) molekuli hüdraat- e. solvaatkiht, veemolekulide kiht, mis on tingitud valgumolekuli elektrilaengutest (pindmine hüdratatsioon) ning hüdrofiilsete (polaarsete) gruppide olemasolust molekulis ($-SH$, $-OH$, mittedissotsieerunud $-COOH$ ja $-NH_2$, $-C(=O)NH_2$ jt.). Viimased tingivad sisemise e. põhilise hüdratatsiooni. Seejuures langeb peptiidsidemete arvele ca 2/3 solvaatveest.

Keskkonna pH-st sõltuvalt võib valk olla polükatioonina või polüanioonina. pH väärtust, mille juures valgumolekuli summaarne laeng on 0, nim. valgu isoelektriliseks täpiks (pI) ning selle juures on valgulahusel minimaalne stabiilsus. Valgu kvantitatiivselt sadestamiseks viiakse keskkonna pH pI-le vastavaks (kõrvaldatakse tõukuvad laengud) ning kasutades neutraalsoolade lahust eemaldatakse molekuli hüdraatkiht. Pöördumatul sadestamisel, mis muudab makrostruktuuri ja kutsub esile valkude denaturatsiooni ning sadestumise, kasutatakse tugevaid happeid, raskmetallide sooli, kõrget temperatuuri.

Valkude klassifikatsioon. Klassifitseerimise võimalusi on mitmeid. Püsikooseline klassifikatsioon, mille järgi eristatakse: 1) polaarsed e. hüdrofiilsed valgud (lahustuvad valgud); 2) apolaarsed e. hüdrofoobsed valgud (praktiliselt lahustumatud valgud); 3) amfihiilsed e. amfiipaatsed valgud (molekuli üks osa on polaarne, teine apolaarne; reeglina on need membraansed valgud). Klassifikatsioon struktuuri järgi (levinum klassifikatsioon), mille kohaselt jagunevad

valgud: 1) lihtvalkudeks (proteiinid e. aprotiiniid), mis koosnevad ainult AH-test ja 2) liitvalkudeks (holoproteiiniid), mis sisaldavad peale AH-te veel mittevalgulist komponenti e. prosteetilist rühma. Liitvalke jagatakse kahte gruppi (konformatsiooni ja lahustuvuse alusel: a) fibrillaarsed valgud (niitjad, kõrvutiasetsevad polüpeptiidahelad), millede hulka kuuluvad järgmised rühmad: kollageenid, elastiinid, keratiinid, fibroiinid, müosiinid; b) globullaarsed valgud (sfäärilised, polüpeptiidahelad on kokkukäädunud, levinuimad ja arvukamad lihtvalgud, siia kuuluvad näiteks kõik ensüümid), millede rühmadeks on: albumiinid, globuliinid, histoonid, protamiinid, prolamiinid, gluteliinid. Järgnevas tabelis on toodud kahe põhirühma iseloomustus.

	Albumiinid	Globuliinid
<u>Lahustuvus</u>		
a) dest. vees	+	-
b) nõrgas soolalahuses	+	+
c) poolküllastatud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	+	- (sadenevad)
d) täisküllastatud $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	- (sadenevad)	+
<u>M_r</u>	15000 - 80000	100 000 kuni mitu miljonit
<u>pI</u>	4,6 - 4,7 (enamik happelised valgud)	6 - 7,3 (nõrgalt happelised, neutraalsed)
<u>Konjugatsioon</u>		Seostuvad kergesti SV ja lipiididega
<u>Adsorbeeriv võime</u>	Adsorbeerivad kergesti SV ja lipiide	
<u>Põhifunktsioonid</u>	Väga osmootse rõhu säilitamine, vere puhverfunktsioon, vee, rasvhapete, vitamiinide, kolesterooli, ravimite jne transport	Funktsioone on väga palju (antikehad; ensüümid; SV, lipiidide, metallide transport jne)
<u>Tähtsamad esindajad</u>	Seerumi albumiin Laktalbumiin (piim) Ovoalbumiin (muna)	Ensüümid Vere globuliinid jne.

Liitvalke jagatakse vastavateks gruppideks prosteetilisest rühma (PR) järgi. Nii eristatakse: fosfoproteiine (PR-ks on fosfaatgrupp), lipoproteiine (PR-ks on fosfolipiidid, ko-

lesterool, triglütseriidid), mukoproteiine (glükoproteiinid) (PR-ks on süsivesikud), nukleoproteiine (PR-ks on NH-d), kromoproteiine (PR-ks on pigment), metalloproteiine (PR-ks on metall).

Valke klassifitseeritakse ka nende funktsiooni alusel (funktsionaalne klassifikatsioon), seda illustreerib järgnev tabel.

Valkude klass funktsiooni järgi	Tüüpilised esindajad	Protekti- line rühm	Molekuli valiskuju
ENSÜMID	ribonukleas trüpsiin syktsinaadi de- hüdrogenaas alkoholi dehü- rogenaas tsutokroom C	- - flaviin- nukleotiidid Zn heem (Fe)	 G (globu- laarne)
TRANSPORT- VALGUD	hemoglobiin sgerumalbumiin muoglobiin transferriin	heem sahhariid heem Fe	 G
STRUKTUUR- VALGUD	kollageen elastiin keratiin siidifibroin	- - - -	F (fibril- laarne)
KONTRAKTIILSED VALGUD	muosiin aktiin tybuliin düneiin	- - - -	 F
KAITSEVALGUD	immunoglobuliinid fibrinogeen trombiin maomürgid bakteriaalsed toksiinid	sahhariid sahhariid sahhariid - -	 G
REGULAARSED VALGUD	insuliin somatotropiin kortikotropiin repressorid	- - - -	 G
RETSEPTOR- VALGUD	rodopsiin kolinoretseptorid (muskariinne, nikotiinne) LDL-retseptor	retinaal (vitamiin A) sahhariid sahhariid	 G
TOITELISED JA VARUVALGUD	gliodiin ovoalbumiin piima kaseiin	- sahhariid fosfor	 G

Teadmiste kontroll

1. Kirjeldage valkude (peptiidide) primaarstruktuuri määramise etappe.
2. Mis on tahkefaasiline peptiidide süntees?
3. Mis on homopolüpeptiidid?
4. Defineerige valkude struktuuritasemed. Mis on nõrgad sidemed? Nimetage need sidemed.
5. Kuidas teostada valkude kvantitatiivset sadestamist? Millistel praktilistel eesmärkidel kasutatakse valkude sadestamist?
6. Mis on denaturatsioon ja mis on renaturatsioon?
7. Mis on koagulatsioon?
8. Kuidas valke klassifitseeritakse?

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, стр. 41-70.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, стр. 35-60.
3. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 3

Teema nr. 1. SÜSIVESIKUTE KVALITATIIVNE NING KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

Teadmiste algtaase:

1. Poolatsetaalne hüdroksüülrühm süsivesikutes. Süsivesikute optiline aktiivsus. D- ja L-rea monoosid. α - ja β -isomeerid. Glükosiidside.
2. Tähtsamad monoosid ning nende derivaadid (glütseeraldehüüd, dihüdroksüütsetoon, erütroos, riboos, desoksüriboos, ribuloos, ksüluloos, seduheptuloos, glükoos, galaktoos, mannoos, fruktoos, glükuroonhape, glükoos-1-P, glükoos-6-P, fruktoos-1-P, fruktoos-1,6-diP, α -D-glükosamiin).
3. Tähtsamad disahhariidid (sahharoos, laktoos, maltoos). Homo- ja heteropolüosid (esindajad).
4. Süsivesikute redoksomadused. Osasoonide ja hüdrasoonide moodustumine.

Üldmõisted. Süsivesikud (SV) on looduses, eriti taimeriigis (80-90% kuivkaalust), laialdaselt levinud. Kuigi loomorganismides on SV-d vaid keskmiselt 2% kuivkaalust, täidavad nad

olulisi bioloogilisi funktsioone: 1. Energeetiline funktsioon. Glükoosi täielik oksüdatsioon rakkudes H_2O -ks ja CO_2 -ks rahuldab 55% kogu organismi energiavajadusest. 2. Struktuurne funktsioon. Monoosid on polüooside monomeerideks; glükoproteiinid ja glükolipiidid on biomembraanide komponendid; mukopolüoosid on luude, kõhrede ja sidekoe komponendid. 3. Kaitsefunktsioon. Selles osalevad limade mukopolüoosid, glükoproteiinsed antikehad ja mitmed verehüübimisfaktorid. Glükuroonhape osaleb kahjulike ainete detoksikatsioonis. 4. Bioregulaatorne funktsioon. SV-d on mõningate hormoonide ja koensüümide komponentideks. 5. Biosünteesiline funktsioon. SV-te metaboliidid - püruvaat, laktaat jt. on rasvhapete, asendatavate AH -te jt. ühendite C -skeleti aluseks. Lähitudes riboosist toimub nukleotiidide ja nukleinhapete biosüntees. 6. Varufunktsioon. Varuainena esineb maksa ja lihaste glükogeen.

Loomorganismide põhisüvivesikuks on glükoos, mis kuulub vere ja koevedelike koostisse. Teistest SV-st esineb loomorganismides glükogeeni, fruktoosi, galaktoosi, riboosi, desoksüriboosi, laktoosi.

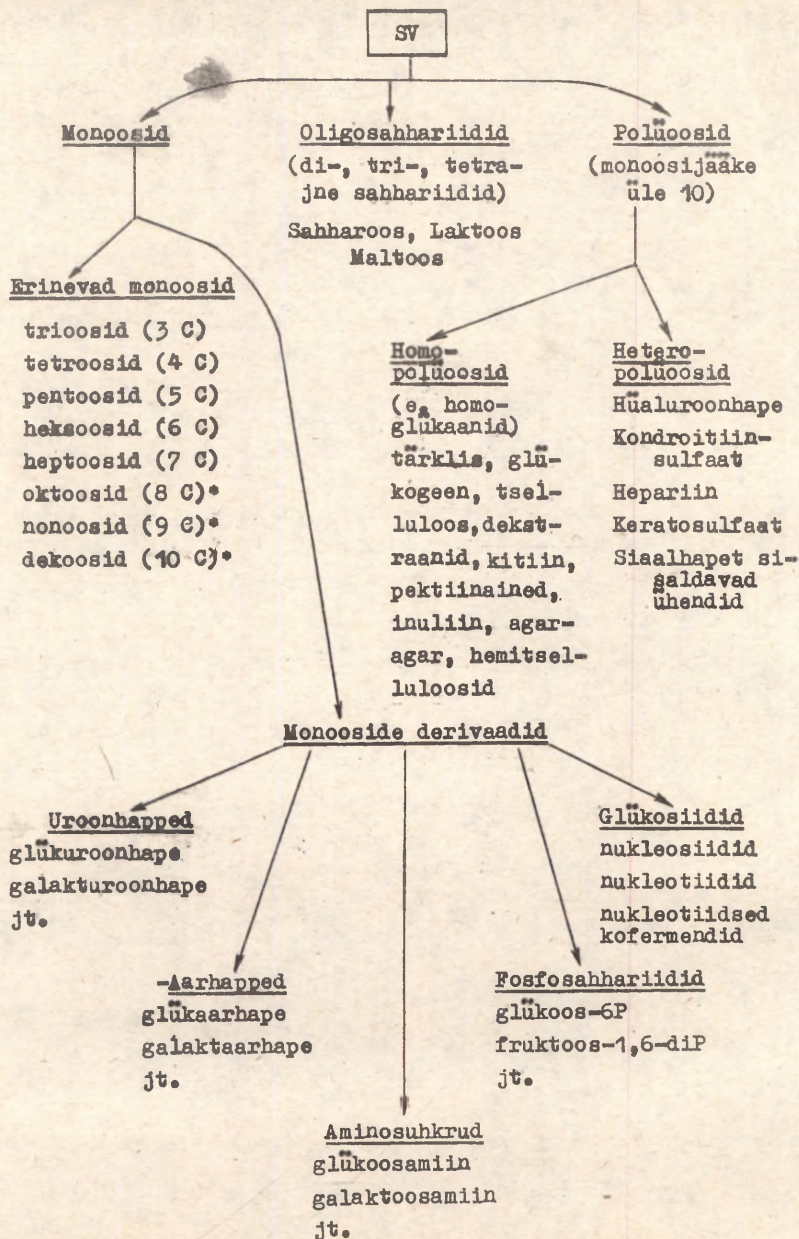
Klassifikatsioon. SV on polühüdroksüaldehydide või polühüdroksüketoonid (või nende mõlemate derivaadid). Kõige levinum on struktuurne klassifikatsioon (vt. skeem).

Teadmiste kontroll

1. Kirjutage glükoosi, fruktoosi ja sahharoosi tsüklilised valemid.
2. Nimetage koos näidetega SV-te tähtsamad bioloogilised funktsioonid.
3. Millised funktsionaalsed rühmad on SV-te redoksomaduste aluseks?
4. Omandage SV struktuurne klassifikatsioon.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, стр. 299-307.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, стр. 60-69.
3. Loengute konspekt.



* looduses ei esine

Teema nr. 2. LIPIIDIDE KVALITATIIVNE JA KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

Teadmiste algtase

1. Glütserool ja tähtsamad rasvhapped (palmitiin-, steariin-, oleiin-, linool-, linoleen- ja arahhidoonhape).
2. Neutraalrasvad ja vahad. Neutraalrasvade hüdroolüüs ja seebistumine.
3. Lipiidide amfibiilsus.

Üldmõisted. Termin "lipiidid" ühendab orgaanilisi aineid, mis on erineva keemilise koostisega, kuid on oma struktuurilt alkoholi ja rasvhapete estrid. Lipiidid ei lahustu vees, kuid lahustuvad väga hästi orgaanilistes lahustites: benseenis, kloroformis, tetrakloorsüsinikus, atsetoonis, kuumas piirituses, dietüüleestris jt. Lipiidide lihtsaim klassifikatsioon jagab lipiidid kaheks klassiks: a) neutraalrasvad e. triatsüülglütseriidid (glütserooli ja rasvhapete estrid), b) lipoidid e. rasvataolised ained.

Levinud on ka teised klassifikatsioonid. Struktuurse klassifikatsiooni järgi jagunevad lipiidid:

I. Lipiidised monomeerid (e. ühekomponendilised lipiidid)

1) Kõrgemad normaalsed, hargnenud ja küllastumata süsivesinikud

2) Kõrgemad alifaatsed alkoholid, aldehüüdid, ketoonid

3) Isoprenoidid ja nende derivaadid (terpeenid, steroidtuuma sisaldavad ühendid: kolesterool, steroidsed hormoonid, sapphapped, vitameerid D, steroidsed glükosiidid ja alkaloidid)

4) Kõrgemad aminoalkoholid (sfingosiin)

5) Kõrgemad polüoosid

6) Rasvhapped

II. Mitmekomponendilised lipiidid (koosnevad lipiidsetest monomeeridest)

1. Lihtlipiidid

a) Neutraalrasvad e. triatsüülglütseriidid (glütserooli ja rasvhapete estrid, loomorganismide lipiidide põhi-mass)

b) Vahad (kõrgemate ühealuseliste alkoholide ja rasvhapete estrid)

- c) Atsuülglütseriinid
- d) Dioolsed lipiidid e. atsüüldiolid (kahealuseliste alkoholide e. dioolide ja rasvhapete estrid)
- e) Steriidid (steroolide e. steriinide ja rasvhapete estrid)

2. Sega- e. liitlipiidid (sisaldavad erinevalt lihtliipiididest mitteliipiidset komponenti)

- a) Fosfolipiidid e. fosfatiidid (lipiidide fosfoestrid)
 - fosfoglütseriidid (glütseriidide fosfoestrid)
 - dioolsed fosfatiidid (dioolsete lipiidide fosfoestrid)
 - sfingofosfolipiidid e. sfingofosfatiidid (sfingosiini fosfoestrid)

b) Glükolipiidid (segalipiidid, mis sisaldavad süsivesikulist komponenti)

- tserebrosiidid
- sulfolipiidid
- gangliosiidid

3. Segamakromolekulid

- a) lipoproteiinid
- b) proteolipiidid
- c) fosfatidopeptiidid
- d) lipoaminoalkoholid
- e) lipopolüüosid

Bioloogiline (füsioloogiline) klassifikatsioon. Selle kohaselt jagunevad lipiidid: a) reservlipiidideks, mis deponeeritakse suures koguses ja kasutatakse organismi energeetilisteks vajadusteks. Täiskasvanud inimese organismis on 10-12 kg lipide, millest 7-8 kg on reservlipiidid (nende põhimassi moodustavad triglütseriidid); b) struktuurseteks lipiidideks, mis on biomembraanide ehituskomponendiks.

Füsiokeemiline klassifikatsioon. Arvestab lipiidide polaarsust ja jagab lipiidid: a) apolaarseteks e. neutraalseteks (ei oma laengut) ja b) polaarseteks (omavad laengut).

Lipiidid täidavad olulisi bioloogilisi funktsioone;

- 1) energeetiline funktsioon - rasvhapete oksüdatsioon on oluliseks energiaallikaks;
- 2) struktuurne funktsioon - fosfolipiidid on bioloogiliste membraanide universaalseteks komponentideks; gangliosiidid on plasmamembraanis olevate mitmete

retseptorite komponentideks; protoplasmaatiline rasv kuulub protoplasma struktuuri; 3) bioregulaatorne funktsioon - seda täidavad mitmed bioaktiivsed steroidid; gangliosiidid taastavad aju elektrilise ärritatavuse; polüküllastatud rasvhapped (arahaadonhape) on prostaglandiinide jt. bioaktiivsete prostanooidide (prostatsükliinid, tromboksaanid) sünteesil lähteühendiks ja biomembraanide tahke-vedela oleku reguleerijad; 4) kaitsefunktsioon - mitmed gangliosiidid ja kardiolipiinid on seotud immunoloogiliste reaktsioonidega; nahaalne rasvkude osaleb mehhaanilises kaitstes ja termoregulatsioonis.

Teadmiste kontroll

1. Kirjutage vabalt valitud triatsüülgütseriidi hüdrolyüsi-reaktsioon.
2. Mis on lipiidid ja kuidas neid klassifitseeritakse?
3. Nimetage (koos näidetega) lipiidide bioloogilised funktsioonid.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, стр. 366-380.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, стр. 84-98.
3. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 4

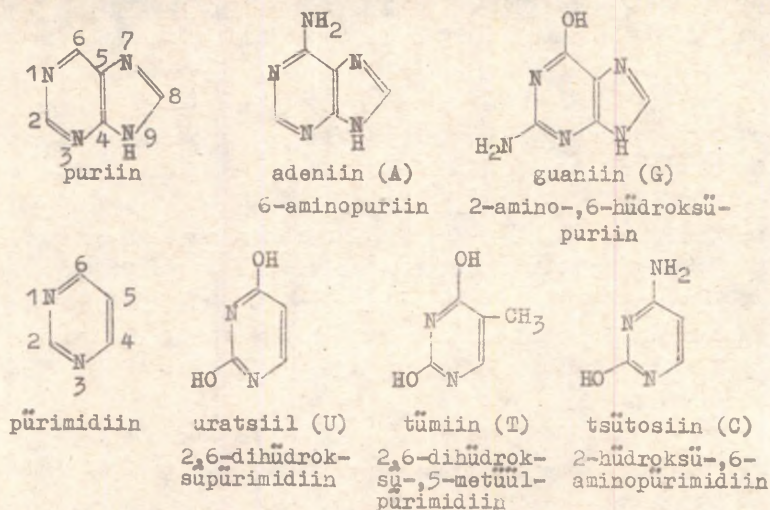
Teema: NUKLEIINHAPETE JA NENDE KOMPONENTIDE KVALITATIIVNE JA KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

Teadmiste algtase

1. Heterotsükliilised N-sisaldavad alused (puriin, pürimidiin).
2. N-glükosiidside ja fosfoesterside.
3. Ribonukleinhape (RNA) ja desoksüribonukleinhape (DNA).

Üldmõisted. Nukleinhapped (NH-d) on lineaarsed polümeerid (M_r 20000 kuni mitu miljonit), millede monomeerideks on mononukleotiidid (nukleotiidid). Nukleotiidide koostisse kuuluvad pentoosijäägid - β -D-riboos või β -D-2-desoksüriboos, mis on aluseks NH-te jagamisel vastavalt ribonukleinhapeteks (RNA) ja desoksüribonukleinhapeteks (DNA), fosfaadijääk ja heterotsükliiline N-alus. Viimane on kas puriiniderivaat (ade-

niin, guaniin) või purimidiinderivaat (uratsiil, tümiin, tsütosiin).



Joon. 6. NH-te N-alused

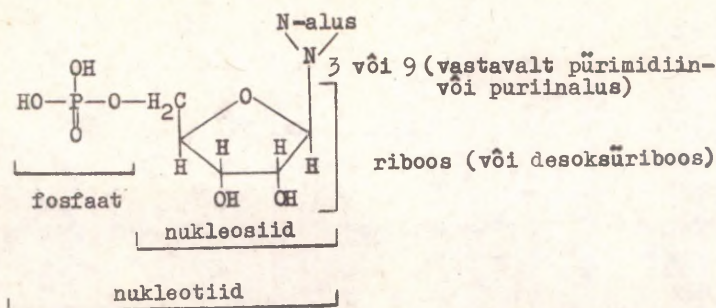
NH-te hüdroksüülühmi sisaldavatele N-alustele on omane keto-enool tautomeeria:



Seostumise korral teiste komponentidega on N-alused keto-vormis.

Peale põhiliste N-aluste on leitud ka nn. minoorseid N-aluseid (põhiliselt vabade vormidena) nagu 2-metuüladeniin, 3-metuüladeniin, 3-metuülguaaniin, 5-metuüütsütosiin, kusiha-pe, ksantiin, hüpoksantiin, kofeiin, teobromiin, tiouratsiil jt. Paljud neist on olulise farmakoloogilise efektiga.

Kui N-alus ühineb N-glükosiidsideme abil riboosi või desoksüriboosiga, saame vastavalt ribo- või desoksüribonukleosiidi. Selle fosforüülumisel moodustub nukleotiid (vt. joonis 7).



Joon. 7. Nukleosiidi ja nukleotiidi ehitus.

Klassifikatsioon. Nukleosiidi nimetus tuleneb N-aluse nimetusest (adenosiin, guanosin, tsütidiin, uridiin, tümüdiin), millele desoksünukleosiidi puhul lisatakse eesliide (desoksüadenosiin jne). Nukleotiidide nimed sisaldavad nukleosiidi nime ning fosforhappe jääkide arvu (adenosiinmonofosfaat e. AMP, guanosinmonofosfaat e. GMP, adensiindifosfaat e. ADP, adensiintrifosfaat e. ATP). Desoksünukleotiidi puhul kasutatakse eesliidet "desoksü-" (dAMP e. desoksüadenosiinmonofosfaat).

NH-tes on vähesel määral leitud ka nn. "minoorseid" nukleosiide (ribotüümiin, dihüdrouridiin, pseudouridiin). Pseudouridiinis on N-alus ja S^v komponent seotunud mitte N-C sidemega, vaid C-C sideme abil. Nukleosiidse ehitusega on ka mitmed antibiootikumid (spongosiin, nebulasiin, puromütsiin, tubertsidiin).

N-aluseid ja nukleotiide iseloomustab neeldumismaksimum 255-280 nm juures, mida kasutatakse nende tuvastamisel.

Kuigi DNA-l ja RNA-l on ühesugune primaarstruktuuri ehitusprintsip, täidavad nad erinevaid bioloogilisi funktsioone. DNA on geneetilise informatsiooni säilitamise ja edasiandmise esmaseks materiaalseks substraadiks. Tema nukleotiidides järjestuses sisalduv informatsioon antakse edasi replikatsiooni teel. RNA erinevad tüübid (mRNA, tRNA, rRNA) osalevad valkude biosünteesi mehhanismis, kindlustades DNA-s oleva informatsiooni translatsiooni valkude spetsiifiliseks primaarstruktuuriks (AH-te järjestuseks).

Teadmiste kontroll

1. Kirjutage adeniini, guaniini, uratsiili, tümiini ja tsütosiini valemid.
2. Andke kõikide ribo- ja desoksüribonukleosiidide ning ribo- ja desoksüribonukleotiidide nimetused ja sümbolid.
3. Kirjutage adensiini, tümidiini, GMP ja CMP valemid.
4. Kirjeldage NH-te primaar-, sekundaar- ja tertsiaarstruktuuri.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, стр. 94-113.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, стр. 69-84.
3. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 5

Teema: ENSÜÜMID

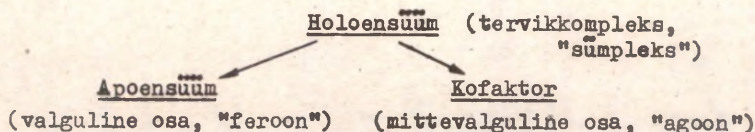
Teadmiste algtase:

1. Keemilise katalüüsi ja katalüsaatori põhimõisted.
2. "Aktiivsed" molekulid ja keemilise reaktsiooni aktivatsioonienergia.
3. Keemiliste reaktsioonide kineetika põhimõisted.
4. Ensüümid kui valgud.

Üldmõisted. Ensüümideks (E-deks) nimetatakse spetsiifilisi liht- ja liitvalke, mis täidavad elusorganismides biokatalüsaatorite funktsiooni. Kuna E-me sünteesitakse organismis endas, siis on nad valgulised endogeensed biokatalüsaatorid. Tänu valgulisele loomusele iseloomustab E-me kõrgmolekulaarsus, amfoteersus, hüdrofiilsus, denatureeruvus ja kristalluvus. E-de jaoks kehtivad kõik katalüsaatoreile iseloomulikud tunnused, kuid ensüümkatalüüs evib ka rida spetsiifilisi jooni (E-me iseloomustab toime kõrge spetsiifilisus ja ülikõrge molekulaarne aktiivsus; E-d on reguleeritava aktiivsusega katalüsaatorid; nende endi süntees on geneetiliselt determineeritud; ensüümreaktsioonide kulg on elusorganismis omavahel koordineeritud).

E-me võib ehituselt jagada kahte gruppi: a) ühekomponendilised ensüümvalgud (koosnevad ainult AH-test), b) kahekomponendilised e. konjugeerunud ensüümvalgud (sisaldavad

peale valgulise komponendi veel mittevalgulist osa). Konjugeerunud ensüümvalkude puhul kasutatakse järgnevat liigendust (joon. 8).



Joon. 8. Konjugeerunud ensüümvalgu komponendid

Konjugeerunud ensüümvalgu kofaktorite hulgas eristatakse metallide ioone ja koensüüme.

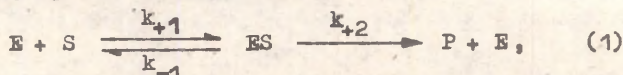
Apoensüümi ja kofaktori funktsioonid on erinevad. Apoensüüm määrab antud konjugeerunud ensüümvalgu toime spetsiifilisuse, mängib põhirolli substraadi sidumises ja aktiveerib kofaktorit. Kofaktor stabiliseerib apoensüümi, kindlustab konjugeerunud ensüümvalgu kõrge aktiivsuse ja osaleb vahetult ensüümkatalüüsis (kofaktorite, eriti koensüümide konkreetset rolli vt. praktikum nr. 6).

Ensüümide klassifikatsioon. Ensüümi nimetus saadakse substraadi (S) nimetusest, millele lisatakse järelliide - "aas". Kasutusel on ka ajalooliselt kujunenud triviaalsed nimetused, näit. pepsiin, trüpsiin, kumotrüpsiin jt. Multienüümkomplekside puhul kasutatakse lisandit "süsteem", näit. püruvaadi dehüdrogenaasi süsteem. Katalüüsitava reaktsiooni tüübi alusel (arvestades ka S-di nimetust) jagatakse E-d kuude põhiklassi: 1) oksüdoreduktaasid - katalüüsivad redoks-protsesse, teostades prootonite ja elektronide ülekannet donaatorilt aktseptorile; 2) transferaasid - katalüüsivad funktsionaalsete gruppide (radikaalide) ülekannet; 3) hüdrolaasid - hüdrolyüsivad veemolekuli osalemisel kõiki sidemeid peale sideme C-C; 4) lüaasid - lõhustavad mittehüdrolyütiliselt sidemeid C-C, C-O, C-N, C-S, kusjuures tihti kaasneb sellega küllastumata ühendite teke; 5) isomeraasid - katalüüsivad isomerisatsioonireaktsioone (näit. aldooside ja keetooside vastastikused üleminekud; funktsionaalsete gruppide molekulisisest ülekandet); 6) ligaasid (süntetaasid) - katalüüsivad sünteesireaktsioone makroergiliste ühendite energia arvel.

E-de täpseks iseloomustamiseks on koostatud rahvusvaheline klassifikatsioon (EC), millesse on koondatud üle 2100 ensüümi. Iga ensüümi tähistamiseks on kehtestatud neljanumbri- line süsteem. Nii näiteks on pepsiini klassifikatsiooni number - EC.3.4.4.1., kus 3 näitab, et ta on hüdrolaaside põhiklassist, 4 - kuulub ala-klassi, mis hüdrolyüsib valkude peptiidsidemeid, järgmine 4 näitab, et ta kuulub ala-ala-klassi, mis lõhub neid peptiidsidemeid, mille karbonüülrühma moodustavad aromaatsed aminohapped (ta on endopeptidaas) ja 1 näitab pepsiini järjekorranumbrit ala-ala-klassis. EC-s on toodud ka antud E-de süstemaatiline ning töönimetus, tema poolt katalüüsitud reaktsioon ning täiendavad märkmed.

Ensüümreaktsiooni kineetika. E-mi molekuli teatud osa nimetatakse aktiivtsentriks. Aktiivtsentri lõplik formeerumine toimub alles S-di manulusel. Substraat seostub aktiivtsentri osaga, mida nimetatakse sidumistsentriks. S-di muundumine produktiks (P) toimub aktiivtsentri katalüütilises osas (katalüütilises tsentris). Osadel E-del esineb peale aktiivtsentri veel regulatoorne e. allosteeriline tsester. Selle lokalisatsioon ei ühti aktiivtsentriga. Allosteerilise tsentri kaudu toimub ensüümaktiivsuse regulatsioon, kuna mingi efektor, ühinedes allosteerilise tsentriga, tingib ensüümvalgu konformatsiooni muutumise, mistõttu muutub ka aktiivtsentri konfiguratsioon (st. S-di katalüüs kas kiireneb või aeglustub).

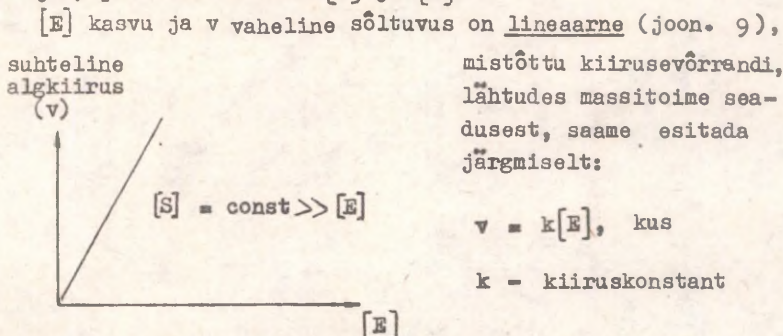
Lihtsustatult ja üldistatult võib ensüümreaktsiooni esitada järgmise üldise skeemina:



kus k_{+1} , k_{-1} ja k_{+2} on vastavate reaktsioonide kiiruskonstandid; ES on ensüüm-substraadne kompleks.

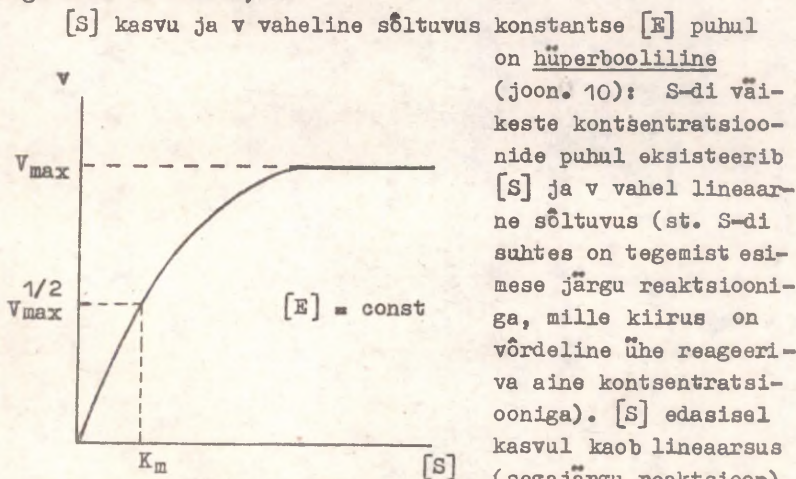
Reaktsioonikiirust väljendatakse seejuures muundunud S-di hulga kaudu ajahüku kohta (mool/s). Ensüümreaktsioonide kineetika, mille aluseks on keemilise kineetika põhiprintsiibid, uuribki reaktsioonikiiruse sõltuvust reageerivate ainete loomusest, nende ainete vastastikusest toimest, E-mi ja S-di kontsentratsioonist (vastavalt $[E]$ ja $[S]$) ning keskkonna faktoritest. Ensüümreaktsiooni kiirusele mõjuvad seega: E-mi ja S-di keemiline loomus, $[E]$ ja $[S]$, temperatuur (tea-

tud piirini), keskkonna pH, aktivaatori või inhibiitori (I) olemasolu, konjugeerunud ensüümvalgu puhul ka kofaktori kontsentratsioon ning keskkonna ioontugevus ja redoks-seisund. Põhilise informatsiooni antud ensüümreaktsiooni mehhanismi kohta annabki reaktsiooni kineetika uurimine. Ensüümreaktsiooni kiirus (v) teiste tingimuste (pH, temperatuur, ioontugevus jne) püsivusel sõltub $[S]$ ja $[E]$.



Joon. 9. Ensüümreaktsiooni kiiruse sõltuvus ensüümi kontsentratsioonist

Reaktsioon kulgeb neis tingimustes maksimaalkiirusega ($v = V_{\max}$), kuna kõik E-mi molekulid on küllastatud S-ga (st. kogu E on ES vormis).



Joon. 10. Ensüümreaktsiooni kiiruse sõltuvus substraadi kontsentratsioonist

saavutab kiirus oma maksimaalväärtuse (V_{\max}) - E-mi molekulide aktiivtsentrid on hõivatud S-di molekulide poolt ning v ei sõltu enam $[S]$ tõusust (nulljärgu reaktsioon).

1913.a. Michaelis ja Menten, lähtudes ülaltoodud ensüüm-reaktsiooni skeemist (1), avaldasid võrrandi, mis kirjeldab hüperboolilist sõltuvust

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (2)$$

Nad võtsid aluseks selle, et reaktsiooni algkiiruste juures P-i teke ES-st on väga aeglane (ainult tühine osa S-st on muutunud P-ks) ja pöördumatu, mis lubas neil k_{+2} kõrvale jätta. Et kogu ensüümi kontsentratsioon süsteemis $[E_t]$ võrdub

$$[E_t] = [E] + [ES], \quad (3)$$

kus $[E]$ - vaba E-mi kontsentratsioon ja et tegemist on teise järgu reaktsioonidega (reaktsioonikiirus on võrdne kiiruskonstandi ja reageerivate ainete kontsentratsiooni korrutisega), siis massitoimeseaduse kohaselt võib avaldada ES tekereaktsiooni kiiruse (v_1) ja ES lõustumisreaktsiooni kiiruse (v_2) järgmiselt:

$$v_1 = (k_{+1}) [E] [S] = (k_{+1}) ([E_t] - [ES]) [S] \quad (4)$$

$$v_2 = (k_{-1}) [ES] \quad (5)$$

Statsionaarses seisundis $d[ES]/dt = 0$, s.t. $v_1 = v_2$ ja järelilikult

$$(k_{+1}) ([E_t] - [ES]) [S] = (k_{-1}) [ES] \quad (6)$$

Siit saab välja tuua tasakaalukonstandi K_s

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s = \frac{[S]([E_t] - [ES])}{[ES]} \quad (7)$$

Avaldades siit $[ES]$

$$[ES] = \frac{[E_t] \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (8)$$

ja asendades $[ES]$ v/k_{-1} -ga ja $[E_t]$ V_{\max}/k_{-1} -ga, said Michaelis-Menten tuletada reaktsioonikiiruse võrrandi:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (9)$$

Täiendades [ES] lõhustumisreaktsiooni kiiruse avaldist
(5) kiiruskonstandiga k_{+2} ($\text{ES} \xrightarrow{k_{+2}} \text{E} + \text{P}$)

$$v_2 = (k_{-1})[\text{ES}] + (k_{+2})[\text{ES}] = (k_{-1}) + (k_{+2})[\text{ES}] \quad (10)$$

ning tuues sisse uue konstandi (K_m)

$$K_m = \frac{(k_{-1}) + (k_{+2})}{k_{+1}} \quad (11)$$

võisid Haldane ja Briggs (1925.a.) ülaltoodu alusel avaldada reaktsioonikiiruse lõpliku väljenduse Michaelis-Menteni võrrandina

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (12)$$

See võrrand, olles ensüümreaktsioonide kineetika põhivõrrandiks, peegeldab v ja $[S]$ vahelist sõltuvust kogu hüperbooli ulatuses.

K_s ja K_m . K_s peegeldab S-di afiinsust ensüümi suhtes ja teda nimetatakse ES dissotsiatsioonikonstandiks:

$K_s = \frac{[\text{ES}]}{[\text{E}] \cdot [\text{S}]} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$. Mida suurem on K_s , seda suurem on k_{-1} ja ES dissotsiatsioon ning järelikult seda väiksem on S afiinsus E-mi suhtes. K_m e. Michaelise konstant on avaldatav reaktsioonikiiruse võrrandist (12)

$$K_m = [S] \cdot \left(\frac{V_{\max}}{v} - 1 \right) \quad (13)$$

Siit järeldub, et kui $v = 1/2 V_{\max}$, siis $\frac{V_{\max}}{v} = 2$ (vt. joonis 10) ehk avaldis (13) omandab järgmise kuju

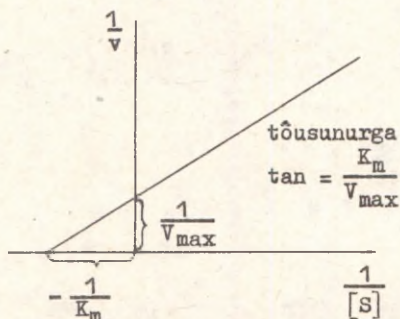
$$K_m = [S]$$

Seega tähendab Michaelise konstant sisuliselt S-di sellist kontsentratsiooni (mool/l), mille puhul ensüümreaktsiooni kiirus võrdub poole maksimaalkiirusega. Mõõtes v väärtsusi erinevatel $[S]$, on võimalik graafiliselt leida V_{\max} ja K_m väärtused. Michaelis-Menteni graafiku (hüperbool) asemel kasutatakse täpsemaid graafilisi meetodeid. Levinuim on Lineweaver-Burki graafiline meetod, mille aluseks on Michaelis-Menteni võrrandi (12) teisendamisel saadud Lineweaver-Burki võrrand.

$$\text{Kui } v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}, \text{ siis } \frac{1}{v} = \frac{1}{[S] \cdot V_{\max} / (K_m + [S])} =$$

$$= \frac{K_m + [S]}{V_{\max} \cdot [S]} \text{ või } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} + [S]}$$

Peale teisendamist $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$ (13), mis ongi Lineweaver-Burki võrrandiks.



Joon. 11. Lineweaver-Burki graafik

(kõige tõelisem) neist on see, mille K_m on vähim. Kui meil on tegemist reaktsioonide ahelaga, siis kogu ahela üldkiiruse limiteerib see üksikreaktsioon, mille S -di K_m on kõige suurem. Järelikult oleks kogu ahela mõjutamiseks vajalik tõsta selle reaktsiooni kiirust (näit. hormoonidega).

Michaelis-Menteni võrrandi üldkuju on alati aluseks ka keerukamatele kineetilistele võrranditele, mis kirjeldavad ensüümreaktsioone, kus on vaja arvesse võtta ES pöörduvat lõhustumisreaktsiooni ($ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_{+2}} E + P$) või reaktsioonis osalevat mitut substrati. Michaelis-Menteni kineetikale ei allu allosteerilised ensüümid (v sõltuvus $[S]$ -st pole hüperbooliline, vaid sigmoidaalne e. S-kujuline). Allosteeriat ja allosteerilisi E-me käsitletakse täpsemalt loengumaterjalis.

Ensüüme iseloomustab toime temperatuurioptimum (temperatuur, mille juures ensüümreaktsiooni kiirus on maksimaalne) ja pH-optimum ($[H^+]$, mille juures ensüümreaktsiooni kiirus on maksimaalne). Temperatuurioptimum on loomorganismide enamike E-de puhul $37-40^\circ C$ (üle selle algab reeglina ensüümide kui valkude termodenaturatsioon) ning pH-optimum asub pH väärtuste 6,0-8,0 vahemikus. Sõltuvalt E-mi lokalisatsioonist võib tema pH-

Kui lähtudes sellest võrrandist kujundada graafik, kasutades koordinaatidena pöördväärtusi $\frac{1}{v}$ ja $\frac{1}{[S]}$, saame sirge (joon. 11).

K_m määramine omab olulist teoreetilist ja praktilist sisu, mille illustreerimiseks tooksimme mõne näite. Kui E-l on mitu S-ti, siis parim

optimum olla aga ka "mittefüsioloogilises" pH piirkonnas (maos toimival pepsiinil on see 1,5-2,5).

Ensüümide kvantitatiivne määramine ja ensüümaktiivsuse väljendamine. Ensüümide kvantitatiivne määramine bioloogilistes materjalides on komplitseeritud, sest määratavat E-mi esineb bioloogilises materjalis väga väikestes hulkades ning ensüümi kui valgu määramist segavad teised valgud. Seetõttu E-mi hulka määratakse kaudselt - aktiivsuse määramise kaudu, st. ensüümi hulka hinnatakse [S] vähenemise või [P] suurenemise järgi ajaühikus. Aktiivsuse määramiseks luuakse alati optimaalsed tingimused - S-di küllastav kontsentratsioon, optimaalne pH ja temperatuur, kofaktori küllastav kontsentratsioon, arvestatakse reaktsiooni üldist stöhiomeetriat. Nimetatud tingimuste püsivusel saab E-mi kvantitatiivseks määramiseks eeldada, et ensüümreaktsiooni kiirus on võrdeline reaktsioonikeskkonda lisatud ensüümi hulgaga, s.t. ensüümi aktiivsust väljendab ensüümreaktsiooni kiirus. Mõõtes reaktsiooni kiirust [S] vähenemise või [P] suurenemise kaudu ajaühikus vastavate kolorimeetriliste, spektrofotomeetriliste, manomeetriliste, tiitrimise abil, saame väljendada ensüümi aktiivsust, s.t. hinnata tema hulka.

Ensüümi aktiivsuse väljendamiseks (hindamiseks) kasutatakse ensüümi aktiivsuse ühikut (U).

U - International enzyme unit - on aktiivsus, mille toimel muundub 1 μ mool substrati ühes minutis. Teisiti öeldes - see on aktiivsus (ensüümi hulk), mis muundab 1 μ mooli substrati ühes minutis.

Iseloomustamaks isoleeritud ensüümi puhtusastet kasutatakse eriaktiivsuse e. spetsiifilise aktiivsuse mõistet. Puhtusastme kasvamisega suureneb antud ensüümivalgu eriaktiivsus, kuna tema suhteline hulk määratavas valgu üldhulgas kasvab.

Eriaktiivsus e. spetsiifiline aktiivsus - ensüümi aktiivsuse ühikute arv 1 mg valgu kohta (U/mg valk e. S μ moolid/min. mg valk).

Lisaks nimetatud mõistetele kasutatakse ensümolooalias ka molekulaarse aktiivsuse ja katalüütilise tsentri aktiivsuse mõisteid.

Molekulaarne aktiivsus - substradi molekulide arv, mille muundab ensüümi üks molekul ühes minutis.

Katalüütilise e. aktiivse tsentri aktiivsus - substraadi molekulide arv, mille muundab ensüümi üks katalüütiline tsenter ühes minutis (oluline mitut katalüütilist tsentrit omavate ensüümide puhul).

Lähtudes SI süsteemist, soovitatakse alates 1972.a. ensüümi aktiivsuse ühiku μ moolilise väljenduse asemel kasutada mõistet katal (kat).

Kat - see on ensüümi aktiivsus (hulk), mis muundab 1 mooli substraati ühes sekundis. Teisiti öeldes - see on aktiivsus, mis vastab ensüümi hulga, mis muundab 1 mooli substraati ühes sekundis ($1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ U}$ ehk $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$).

Kasutades ensüümi aktiivsuse ühikuna kat mõistet, muutub ka eriaktiivsuse mõiste väljendus.

Eriaktiivsus - ensüümi aktiivsuse ühikute arv 1 kg valgu kohta (kat/kg valk).

Molekulaarse aktiivsuse ja katalüütilise tsentri aktiivsuse mõiste aktiivsuse uues väljenduses ei muutu.

Inhibiitorid ja aktivaatorid. Inhibiitoriteks (I) nimetatakse faktoreid, mis kas osaliselt või täielikult pidurdavad (inhibeerivad) ensüümreaktsiooni kiirust. Inhibeerimine jaguneb tinglikult: a) mittespetsiifiline inhibeerimine (kõrge temperatuur, koagulatsioon, denaturatsioon, tugevad happed ja leelised põhjustavad mistahes E-mi inhibeerimise, mis konkurentsri puudumise tõttu S ja I vahel E aktiivse tsentri pärast on tavaliselt pöördumatu või ainult osaliselt pöörduv); b) spetsiifiline inhibeerimine (I toimib ainult konkreetsele E-le või rühmale analoogilise toimega E-dele). Spetsiifilise inhibeerimise kaudu teostub organismi elutegevuse aluseks olevate ensüümoloogiliste reaktsioonide põhiline regulatsioon. Spetsiifiline inhibeerimine on aluseks ka paljude looduslike ja sünteetiliste ühendite kasutamisele ravimitena.

Aktivaatorid on ensüümreaktsiooni kiirust tõstvad faktoriid, mis tinglikult jagunevad: a) ioonid-aktivaatorid (näit. Cl^- süljel amülaasile, Ca^{2+} lipaasile, Na^+ ja K^+ Na,K-adenosiintrifosfataasile jt.); b) anorgaanilised ja orgaanilised ühendid kui aktivaatorid (näit. HCl pepsiinile, cAMP proteiinkinaasidele, sapphapped lipaasile, proteiinkinaasid vastavale E-le jt.); c) spetsiifiline aktivatsioon (osalise proteo-

lõuusi abil, näit. vere hüübimisfaktorite aktivatsioon, valkude seedimises osalevate ensüümide - pepsiini, trüpsiini aktivatsioon autokatalüüsi abil jt.).

Teadmiste kontroll

1. Selgitage mõisteid "ensüüm" ja "koensüüm".
2. Millistest faktoritest ja miks sõltub ensüümreaktsiooni kiirus?
3. Mis on K_s , K_m ja V_{max} ?
4. Miks on ensüümidel temperatuuri optimum ja pH-optimum?
5. Mis on ensüümi aktiivsuse ühik, eriaktiivsus, molekulaarne aktiivsus ja aktiivse tsentri aktiivsus?
6. Selgitage mõisteid "aktivaator", "inhibiitor", allosteeriline regulatsioon.

Kasutatud kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, lk. 114-168.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, lk. 122-129, 143-163.
3. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 6

Teema: VITAMIINIDE KVALITATIIVNE JA KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

Teadmiste algtase:

1. Bioaktiivsete ainete ja bioregulatsiooni mõiste.
2. Ekso- ja endogeensed bioregulaatorid.
3. Konjugeerunud ensüümvalgud.

Üldmõisted. Vitamiinideks nimetatakse heterogeenseid madalmolekulaarseid bioaktiivseid orgaanilisi aineid, mis on absoluutselt hädavajalikud organismi metaboolsete protsesside normaalseks kulgemiseks. Kuna heterotroofsed organismid vitamiine ei sünteesi (või sünteesivad mitteküllaldases koguses), siis nende jaoks on vitamiinid eksogeensed toiduga saadavad asendamatud minoraalsed komponendid. Nende ööpäevane vajadus on mõeldav milli- või mikrogrammidega. Kõiki eksogeenseid asendamatud orgaanilisi ühendeid (näit. asendamatud AH-eid, essentsiaalseid küllastumata rasvhappeid) ei nimetata vitamiinideks, kuna, erinevalt vitamiinidest, kasutatakse neid rakude ehitusmaterjalina ja osaliselt ka energiaallikana. Ter-

min "eksogeenne" kehtib vitamiinide kohta teatud suhtelisusega, kuna: 1) mõningaid vitamiine sünteesib seedetrakti mikrofloora või loomorganism ise (näit. vitamiin PP sünteesitakse trüptofaanist); 2) vitamiinide suhtes esineb liikide vahelisi erinevusi (koer ja rott ei vaja vitamiin C saamist toiduga; inimene, ahv ja merisiga vajavad), 3) vitamiinide ja toidu teiste komponentide vahel esinevad dünaamilised vastastikused suhted (näit. vitamiin PP defitsiidi kompenseerib trüptofaani rohkus toidus, koliini defitsiidi - metioniini rohkus toidus).

Vitamiinide bioloogiliseks funktsiooniks on metaboolsete protsesside normaalse kulgemise tagamine. Konkreetsel vitamiinil on teatud füsioloogiline funktsioon, mis tuleneb tema biokeemilisest funktsioonist. Oletatakse, et antud vitamiin täidab kõigis loomorganismides samasugust funktsiooni, kuigi mõningate organismide puhul pole ta toidu asendamatu komponent. Vitamiinide osa metabolismis avaldub selles, et enamik vitamiine kuulub koensüümses vormis konjugeerunud ensüümide struktuuri.

Vesilahustuvaid vitamiine peab organism saama iga päev, rasv lahustuva vitamiinide (imenduvad koos lipiididega) jaoks eksisteerib maksas lühiajaline varu. Vitamiini defitsiit tekib eeskätt mittebalansseeritud dieedi puhul (s.t. et toidu komponentide vahekord pole õige), mille peamised põhjused on: 1) majanduslikud faktorid (põllumajanduse ühekülgne arendamine); 2) bioloogilised faktorid (raseduse, lapsea puhul on mõningate vitamiinide vajadus kõrgenenud); 3) tehnoloogilised faktorid (näit. toiduainete konserveerimine vähendab nende vitamiinisisaldust); 4) olme faktorid (ühekülgsed toitumistavad, alkoholism).

Vitamiini defitsiit tekib ka teatud haigusliku seisundi puhul. Nendeks oleksid: 1) vitamiinide imendumishäired seedetrakti haiguste puhul; 2) seedetrakti mikrofloora pärssimine antibiootikumidega ravimisel (häirub foolhappe, vitamiin K, vitamiin PP jt. süntees); 3) maksahaigused (häirub rasv lahustuva vitamiinide deponeerimine ja vitamiin A moodustumine tema provitamiinist); 4) ravimite tingitud vitamiinide metabolismi häired (näit. mitmete tuberkuloosivastaste ravimite tarvitamine tingib mõnede B-grupi vitamiinide kõrgenenud vajaduse).

Vitamiinide defitsiidil sugenevad esialgselt üldist laadi häired - hüpovitaminoosid (väsimus, töövõime langus, kehakaalu langus, vastuvõtlikkuse suurenemine mitmesugustele haigustele jne.), mis tekivad olenemata sellest, millist konkreetset vitamiini organism ei saa piisavalt. Vitamiinide kestva defitsiidil tekivad aga iga vitamiini jaoks spetsifilised haiguspildid (avitaminoosid), mis tulenevad juba konkreetse vitamiini puudusest (näit. vitamiin D puhul rahhiit, vitamiin C puhul skorbuut, vitamiin A puhul kanapimedus jne.). Vitamiinide defitsiidi geneesi alusel eristatakse: 1) alimentaarseid hüpovitaminoose (tekivad vitamiinidevaese toidu puhul), 2) sekundaarseid hüpovitaminoose (põhjuseks on vitamiinide metabolismi häired) ja 3) polühüpovitaminoose ja polüavitaminoose (kujuneb välja mitme vitamiini üheaegsel defitsiidil).

Vitamiini ülemäärasel manustamisel tekivad organismis patoloogilised muutused, mida nimetatakse hüpervitaminoosideks. Toksilisemad on antud aspektis rasv lahustuvad vitamiinid. Nii viib vitamiin D liig kudede kaltsifikatsioonile, neerude kahjustumisele koos järgneva ureemiaga.

Vitamiinide kui bioregulaatorse toimega ainete efekt sõltub ka vastavate antivitamiinide olemasolust organismis. Antivitamiinideks nimetatakse vitamiinide struktuurseid analooge, mis on võimelised ühinema vitamiini asemel konjugeerunud ensüümi valgulise osaga ja blokeerivad seetõttu antud vitamiini bioloogilise toime kas osaliselt või täielikult. Antivitamiine esineb looduses, kuid neid saab ka sünteesida (antivitamiine käsitletakse konkreetsemalt vastaval loengul).

Vitamiinide klassifikatsioon. Kaasajaks on avastatud üle 20 vitamiini ja vitamiinitaolise ühendi. Vitamiine tähistatakse suurte ladina alfabeedi tähtedega. Osade vitamiinide puhul tähistab antud täht tervet ainete gruppi, mis on lähedase või sarnase füsioloogilise efektiga, kuid mõnevõrra erineva keemilise struktuuriga. Sellisel juhul nimetatakse grupi konkreetset esindajat vitameeriks (isoteeliks). Vitameere esineb rasv lahustuvate vitamiinide puhul.

Kuna vitamiinide keemiline struktuur on väga heterogeenne, mis ei võimalda nende klassifitseerimist, siis jagatakse vitamiinid lahustuvuse alusel rasv lahustuvateks ja vees lahustuvateks.

Tabel 2

Vitamiinide klassifikatsioon, terminoloogia, füsioloogiline põhitoime ning hüpo- ja avitaminoosid

Vitamiinid	Füsioloogiline hüpo- ja avitaminoosid põhitoime	
<u>Rasvlahustuvad vitamiinid</u>		
A-grupi vitamiinid: A ₁ (retinool, akseroftool), A ₂ , neovitamin A	antikseroftalmiline	Hemeraloopia (kanapi-medus). Kseroftalmia. Keratomalaatsia (naha hüperkeratoos)
D-grupi vitamiinid: D ₂ (ergokaltsiferool), D ₃ (kolekaltsiferool)	antirahhiitiline	Rahhiit. Kaltsiumi ja fosfori metabolismi häired
E-grupi vitamiinid: (α -, β -, γ -, δ -tokoferoolid, 8-metuültokotrienool)	sigimisvitamiin antisteriilne	Spermatogeneesi häired. Seemnejuhade düstroofia. Nurisunnitused. Lihascoe düstroofilised muutused
K-grupi vitamiinid: K ₁ (fullokinoon), K ₂ (menakinoon-6)	antihemorraagiline	Vere hüübimise häired. Hemorraagiline diatees
Vitamiinid F (küllastumata essentsiaalsed rasvhapped: linool- ja linoleenhape)		Lipiidide metabolismi häired. Prostaglandiinide metabolismi häired
<u>Veeslahustuvad vitamiinid</u>		
Vitamiin B ₁ (tiamiin, aneuriin)	antineuriitiline	Beri-beri. Polüneuriit. Südametegevuse ja seedimise häired. Süsivesikute metabolismi häired
Vitamiin B ₂ (riboflaviin, laktöflaviin)	antistomaatiline, antiglossiitne	Stomatiit. Glossiit. Silma sarvkesta vaskularisatsioon
Vitamiin B ₃ (pantooteenhape)	antidermaatiline	Dermatiidid. Juuste depigmentatsioon. Sisaelundite kahjustused
Vitamiin B ₅ (nikotiinamiid, niatsiin) PP	antipellagrailine	Pellagra. Dermatiit, djarroa, ajutegevuse häired
Vitamiin B ₆ (püridoksiin)	antidermaatiline	Dermatoosid. Epileptiformsed krambid
Vitamiin B ₁₀ (foolhape) B ₁₁ B _C	antianeemiline	Vereloomehäired. Kehvveresus

Vitamiinid	Füsioloogiline põhitoime	Hüpo- ja avitaminoosid
Vitamiin B ₁₂ (tsüanokobalamiin)	antianeemiline	Pernitsioosne (pahaloomuline) kehveresus
Vitamiin B ₁₅ (pangamhape, glükonodimetuul-aminoatsetaat)	antianoksiiline	Lipiidide metabolismi häired. Maksa rasvinfiltratsioon
Vitamiin H (biotiin)	antiseborroiline	Spetsiifiline dermatiit. Lipiidide metabolismi häired
Vitamiin C (L-askorbiinhape)	antiskorbutiline	Skorbuut
Vitamiin P (bioflavonoidid, rutiin, tsitriin)	kapillaare tugevdav toime	Verevalumid
p-Aminobensoehape (pAB)	antibakteriaalne	
Inosiit (müoinsiid, lipotroopne faktor), B ₈	antisklerotiline	Lipiidide metabolismi häired. Juuste väljalangemine

Vees lahustuvate vitamiinitaoliste ühendite hulka kuuluvad vitamiin B₁₃ (oroothape), vitamiin B₇ (karnitiin), vitamiin U (S-metuülmetsioniin), lipohape (vitamiin N), koiliin (vitamiin B₄) ja koensüüm Q.

Vitamiinide määramine. Vitamiinide määramise meetodeid võib liigitada kolme rühma: 1) füsiko-keemilised meetodid, mis baseeruvad reeglina sellel, et vastavate reagentidega annavad teatud vitamiinid kindla neeldumismaksimumiga värvilisi ühendeid (näit. antimontrikloriidi (SbCl₃) reageerimisel vitamiin A-ga tekib sinise värvusega ühend neeldumismaksimumiga 620 nm). Nende meetodite aluseks võib olla ka mõnede vitamiinide enda neeldumismaksimum (näit. vitamiin A-1 on see 328-330 nm) või nende oksüdeerumisproduktide fluorestsents (vitamiin B₁ ja B₂ puhul); 2) mikrobioloogilised meetodid, mis baseeruvad sellel, et teatud mikroorganismide kasvukiirus korreleerub uuritava vitamiini sisaldusega söötmes; 3) bioloogilised meetodid, mis rajanevad antud vitamiini bioloogilisele efektile. Viies loomorganismi kindlale dieedile, milles varieeritakse määratava vitamiini hulka, saame leida selle vitamiini minimaalse koguse 100 grammis uuritavas toi-

dus, mis veel väldib avitaminoosi tekke (profülaktiline ühik) või suudab välja ravida tekkinud avitaminoosi (terapeutiline ühik). Sõltuvalt katselooma liigist raagitakse sel juhul "ro-ti", "hobuse" ühikutest, mis on tinglikud suurused.

Mikrobioloogilised ja bioloogilised meetodid on töömahukad, aeganõudvad ja kulukad, mistõttu neil on rohkem ajalooline tähendus.

Teadmiste kontroll

1. Mida nimetatakse vitamiinideks? Mis on hüpo-, hüper- ja avitaminoosid?
2. Kuidas klassifitseeritakse vitamiine? Andke vitamiinide kõik nimetused.
3. Selgitage vitamiinide määramise võimalusi.
4. Omandada vitamiinide valemid, funktsioonid ja nende ööpäevase vajaduse normid.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, lk. 169-221.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, lk. 339-370.
3. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 7

Teema: KOFAKTORID (KOENSÜÜMID) JA NENDE MÄÄRAMINE

Teadmiste algtase:

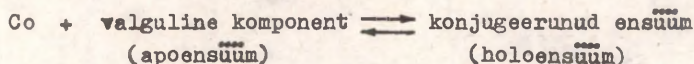
1. Aktivaatorite mõiste.
2. Liitvalkude ja konjugeerunud ensüümvalkude mõisted.

Üldmõisted. Kõiki faktoreid, mis on olulised makromolekulide struktuurseks ja/või funktsionaalseks terviklikkuseks, nimetatakse kofaktoriteks. Tinglikult võib kofaktoreid jagada kolme gruppi: 1) aktiveerivad ioonid kui kofaktorid - ei kuulu makromolekuli struktuuri, kuid on olulised tema vastava funktsiooni täitmiseks; näit. Cl^- osaleb amülaasi natiivse konformatsiooni tagamisel; 2) prosteetiline rühm kui kofaktor - kuulub makromolekuli struktuuri ning on reeglina valgulise komponendiga seotud kovalentse sidemega, mistõttu teda saab eraldada vaid valgulise osa denatureerimisega, näit. Cu^{2+} ja Zn^{2+} superoksiiddismutaasis, ferriprotoporfüriin ka-

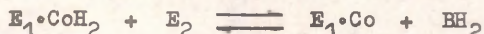
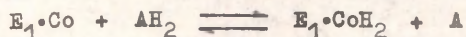
talaasis, hemiinne grupp tsütokroomides (NB! põhimõtteliselt kuuluvad siia liitvalkude kõik mittevalgulised komponendid);
 3) koensüümid kui kofaktorid - on madalmolekulaarsed orgaanilised ühendid, mis kuuluvad konjugeerunud ensüümide struktuuri, olles ensüümvalguga seotud suhteliselt nõrkade sidemetega, mistõttu suhteliselt kergesti dissotsieeruvad.

Antud teoreetilis-laboratoorse praktikumi ülesandeks on käsitada lähemalt koensüümseid kofaktoreid.

Koensüümide iseloomustus. Termin "koensüüm" (Co) võttis 1897.a. kasutusele Bertrand. Võrrelduna konjugeerunud ensüümi valgulise osaga on Co termostabiilne. Tema ühinemine valgulise osaga on pöörduv reaktsioon:



Kui apoensüüm määrab antud holoensüümi spetsiifilisuse substraadi või reaktsiooni tüübi suhtes, siis Co osaleb vahe- tult selle holoensüümi poolt katalüüsitava reaktsiooni mehha- nismis ja tema juuresolek on absoluutselt vajalik. Nii põh- justab Co eemaldamine (näit. dialüüsi abil) selle ensüüm- reaktsiooni katkemise. Enamikel juhtudel on Co elektronide, aga ka aatomite ja funktsionaalsete rühmade vaheülekandjaks ensüümreaktsioonis ühelt metaboliidilt teisele. Co võib olla ka mitme E-mi vaheliseks siduvaks lüliks.



Toodud reaktsioonides E_1 reageerib S-ga ning vesinikuaatomid seotakse Co-ga. Et järgmine S-di molekul saaks reageerida E_1 -ga, peab kompleks $E_1 \cdot \text{CoH}_2$ reoksüdeeruma, mida teostab tei- ne ensüüm E_2 . Sellisel juhul Co-mi nimetatakse kosubstraadiks, Co-me sisaldavad EC-s toodud kõik ensüümide põhiklassid, v.a. hüdrolaasid.

Koensüümide ja vitamiinide vastastikused seosed. Kaas- ajaks on selgunud, et enamik Co-me on vastava vitamiini de- rivaadiks. Co-de ja vitamiinide vahelist seost näitab tabel nr. 3.

Tabel 3

Vitamiin	Reaktsioon, milles tekib Co	Koensüümi nime- tus (sümbol)	Funktsioon koensüümina
A			rodopsiini mitte- valguline komponent
K			mõnede vere hüübimisfaktorite sünteesi ensüümide koensüüm
B ₁	pürofosforüülimine	kokarboksülaas (TPP)	α-ketohapete dekarboksüülimine ja aldehüüdrühmade ülekanne
B ₂	fosforüülimine ATP-ga	flaviinmononukleotiid (FMN)	dehüdrogeenimine (redutseerivate elementide ülekanne)
"	AMP jäägi ülekanne ATP-lt FMN-le	flaviinadeniindinukleotiid (FAD)	dehüdrogeenimine (redutseerivate elementide ülekanne)
B ₃ (panto- teenhape)	vitamiin on Co struktuuri osa	koensüüm-A (CoA-SH)	atsetüül- ja atsuülrühmade ülekanne
B ₅ (niatsiin)	vitamiin on Co struktuuri osa	nikotiinhappeamiidadeniindinukleotiid (NAD ⁺)	dehüdrogeenimine (redutseerivate elementide ülekanne)
"	vitamiin on Co struktuuri osa	nikotiinhappeamiidadeniindinukleotiidfosfaat (NADP ⁺)	dehüdrogeenimine (redutseerivate elementide ülekanne)
B ₆	fosforüülimine	püridoksaalfosfaat	aminorühma ülekanne transamiinimisgl. AH-te karboksüülimine
foolhape	hüdrogeenimine	5,6,7,8-tetrafoolhape (FH ₄)	ühesüsinikuliste fragmentide ülekanne
B ₁₂	rühma asendus	kobalamiidised koensüümid	metüülrühma ülekanne
Biotiin		biotiin	CO ₂ ülekanne

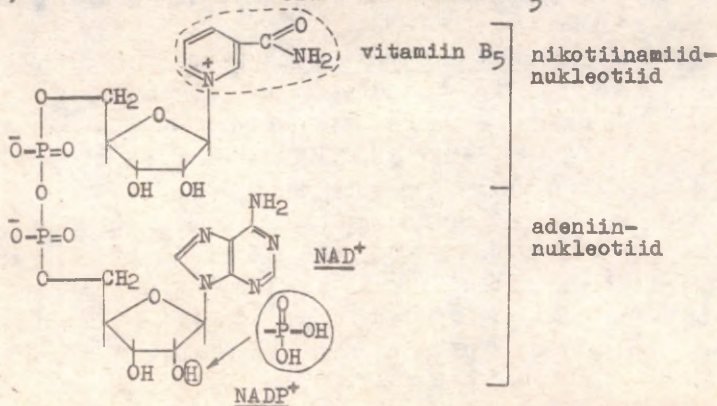
Vitamiin	Reaktsioon, milles tekib Co	Koensüümi nimetus (sümbol)	Funktsioon koensüümina
C			redutseerivate elementide ülekanne
B ₁₂		karnitiin	atsüüljäägi ülekanne
Lipohape		S-atsüüllipoaat	atsüülgruppide ülekanne
CoQ		CoQ	dehüdrogeenimine

Koensüümide funktsionaalne klassifikatsioon. Kuna üks ja sama Co võib osaleda mitmes ensüümi poolt katalüüsitud reaktsioonis, siis levinuim on Co-de funktsionaalne klassifikatsioon (vastavuses ka ensüümide klassidega).

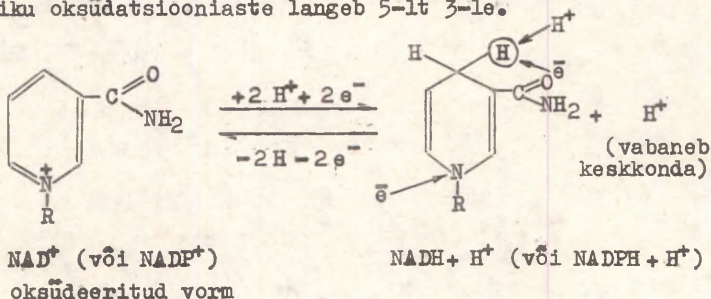
Järgnevas klassifikatsioonis on toodud kõik koensüümid. Nagu sellest klassifikatsioonist selgub, on tähtsamateks koensüümideks redutseerivaid elemente või rühmi ülekandvad koensüümid (NAD^+ , NADP^+ , FMN, FAD, KoQ, atsetüül-CoA, FH_4 jt.).

I Koensüümid, mis osalevad redutseerivate elementide (elektronid, prootonid) ülekandes, s.t. oksüdo reduktaaside koensüümid

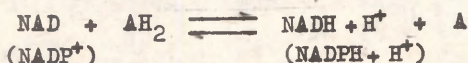
1. Nikotiinamiidadeniindinukleotiid (NAD^+) ja nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat (NADP^+). Need on dinukleotiidsed Co, mille reaktiivseks osaks on vitamiin B₅.



NAD^+ ja NADP^+ on mitmesuguste dehüdrogenaaside (DH-de) koensüümideks. NAD^+ - või NADP^+ -sõltuva DH-si toimemehhanism oleks järgmine: S-lt võetakse 2 vesinikuaatomit (s.t. 2 H^+ ja 2 e^-), millest üks prooton ja 2 elektroni seostuvad NAD^+ või NADP^+ reaktiivse osaga. NAD^+ (või NADP^+) läheb redutseeritud vormi - $\text{NADH} + \text{H}^+$ (või vastavalt $\text{NADPH} + \text{H}^+$), püridiinse lammastiku oksüdatsiooniaste langeb 5-lt 3-le.



Sisuliselt toimub reaktsioon seega oksüdeeruva S-di ja Co vahel (üldskeem oleks järgmine).

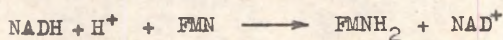


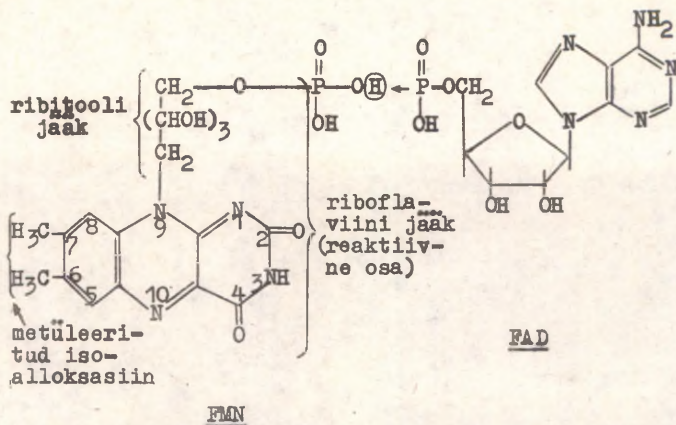
Selle, millist konkreetset S-ti dehüdrogeenitakse, määrab ära DH-si valguline osa.

Antud reaktsioon on pöörduv, s.t. redutseeritud koensüüm viiakse alati tagasi oksüdeeritud vormi - reoksüdeeritakse. $\text{NADH} + \text{H}^+$ reoksüdeeritakse enamasti flaviinsete dehüdrogenaaside (vt. järgmised Co-d) abil, $\text{NADPH} + \text{H}^+$ aga mitmetes nn. taandavates sünteesides.

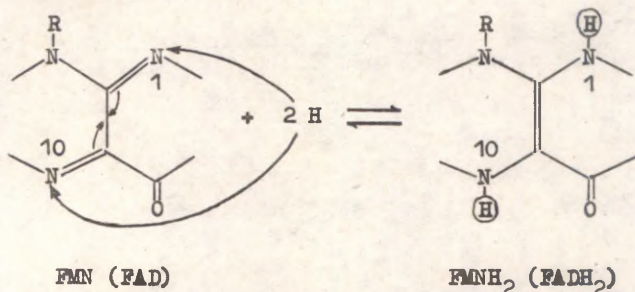
2. Flaviinmononukleotiid (FMN) ja flaviinadeniindinukleotiid (FAD). Need koensüümid on riboflaviini e. vitamiin B_2 derivaadid. FMN kujutab endast fosforüleeritud riboflaviini. Kui liitub veel ATP-st pärinev AMP jääk, moodustub FAD. Antud flaviinsed koensüümid on mitmete DH-de Co-ks.

FMN ja FAD on tugevasti seotud apoensüümidega flavoproteiidideks (flaviinsed DH-d), mis osalevad mitmete substraatide (suktsinaat, atsetüül-CoA jt.) dehüdrogeenimisel ja $\text{NADH} + \text{H}^+$ reoksüdeerimisel hingamisahelas. Viimaseid võib lugeda tsentraalseteks DH-deks, mis viivad $\text{NADH} + \text{H}^+$ reoksüdeerimise läbi järgmise skeemi kohaselt:

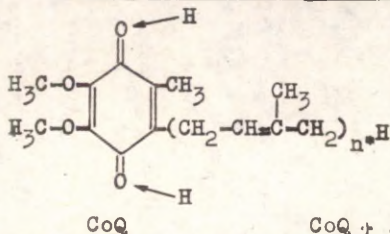




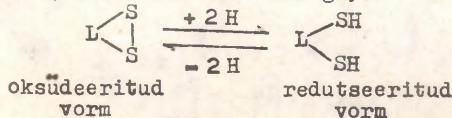
FMN ja FAD osalevad vesinikuaatomite ülekandes järgmise toimemehhanismi kohaselt:



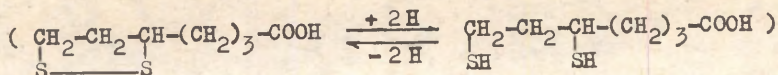
3. Koensüüm Q (CoQ) e. ubikinoon. CoQ on hingamisahela komponent, mis reoksüdeerib redutseeritud flaviinse koensüümi. Redutseeritud CoQ reoksüdeeritakse tsütokroomide poolt (vt. hingamisahel).



4. Lipohape (L-S-S-L). Teostab vesinikuaatomite poorduvat transporti (tavaliselt koos TPP-ga).

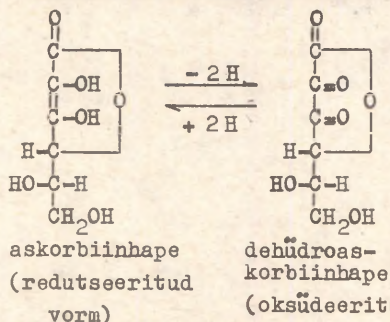


* n varieerub 6 - 10-ni (loomorganismis n = 10; CoQ₁₀)



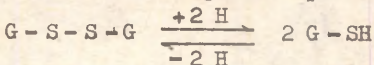
5. Mitmed redokssüsteemid kui prootonite ja elektronide ülekandjad

a) süsteem askorbiinhape/dehüdroaskorbiinhape, mis teostab

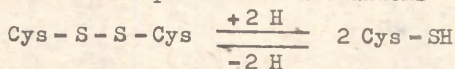


vesinikuaatomite pöörduvat ülekannet. Askorbiinhape täidab koensüümset funktsiooni mitmetes ensüümreaktsioonides (näit. tsütokroom P₄₅₀ sünteesil; vt. oksüdeerimine endoplasmaatilises retiikulumis)

b) süsteem oksüdeeritud/redutseeritud glutatioon, mis teostab vesinikuaatomite pöörduvat ülekannet reaktiivse tioolrühma abil (näit. formaldehüüddehüdrogenaasi poolt katalüüsitava reaktsioonis)



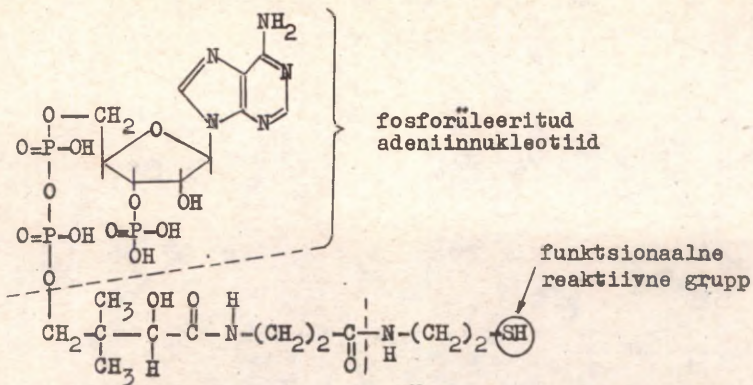
c) süsteem tsüstiin/tsüsteiin. Antud süsteem on samuti võimaline vesinikuaatomite pöörduvaks ülekandeks



d) porfüriinrõngast sisaldavad ühendid kui koensüümid. Teostavad elektronide pöörduvat ülekannet porfüriinrõngas oleva raua oksüdatsiooniastme muutuse kaudu (vt. tsütokroomid, katalaas, peroksüdaas).

II Koensüümid, mis osalevad radikaalide ning aatomite rühmade ülekandes, st. transferaaside koensüümid

1. Koensüüm A (CoA-SH). CoA-SH kuulub tähtsamate Co-de hulka. Ta viib läbi atsetüül ($\text{CH}_3 - \text{C} \equiv \text{O}$) jt. atsetüüljääkide ($\text{R} - \text{C} \equiv \text{O}$) ülekannet oma reaktiivse tioolgrupi abil.



fosforüleeritud
adeniinnukleotiid

funktsionaalne
reaktiivne grupp

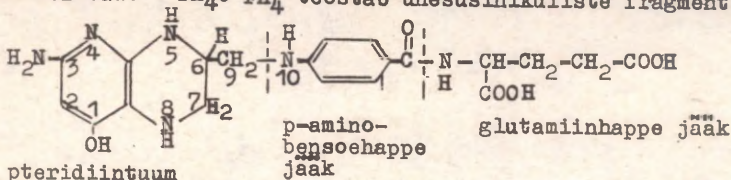
vitamiin B₃ (panto-
teenhappe) jääk

tsüsteamiin e. β-merkaptota-
noolamiin (Cys dekarboksüüli-
mise produkt)

CoA-SH

Ülekantav atsüüljääk seostub koensüüm A-ga makroergilise si-
deme abil. Põhiline ülekantav atsüüljääk on atsetüüljääk,
mille puhul moodustunud ühendit nimetatakse atsetüül-CoA e.
aktiivseks atsetaadiks ($\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})\text{SCoA}$). Atsetüül-CoA on üks
sõlmetaboliite, mille kujul toimub atsetüüljääkide ülekan-
ne mitmetes sünteesides (rasvhapete, atsetüülkoliini, atsee-
toatsetaadi, kolesterooli jt. süntees), samuti atsetüüljäägi
sisestumine trikarboksüülhapete tsükklisse.

2. Tetrahydrofoolhape (FH₄). Foolhappe pteridiintuuma hüd-
rogeenimisel asendites 5,6,7,8 moodustub vitamiini koensüüm-
ne derivaat - FH₄. FH₄ teostab ühesüsinikuliste fragmentide

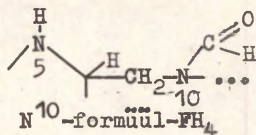
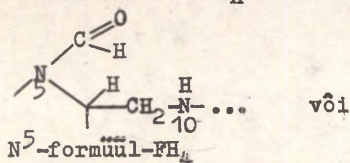


FH₄

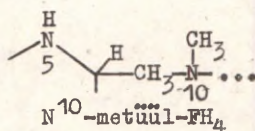
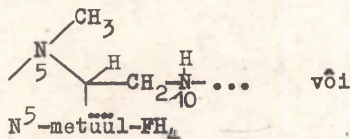
ülekannet, kusjuures selle fragmendi annavad enamasti glüt-
siini Cα, seriini Cβ ja metioniini ning koliini metüülrühm.
Peale selle võivad selle fragmendi anda trüptofaani indool-
rõnga ja histidiini imidasoolrõnga teine süsinik, aga ka
formaldehüüd, metaanhape ja metanool. Ülekantav fragment
seostub FH₄-ga N⁵ või N¹⁰ külge (või mõlema külge korraga)

vesinikuaatomi asemele, nii nagu on näidatud allpool:

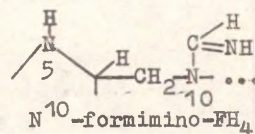
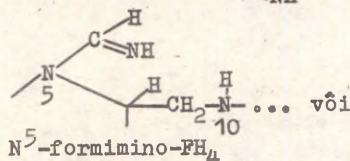
a) formüüljäägi ($-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{H}$) ülekanne



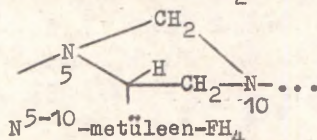
b) metüüljäägi (CH_3-) ülekanne



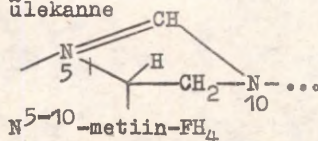
c) formiminojäägi ($-\overset{\overset{\text{H}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{NH}$) ülekanne



d) metüleenjäägi ($-\text{CH}_2-$) ülekanne

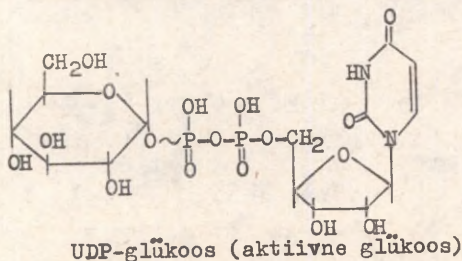


e) metiinjäägi ($=\text{CH}-$) ülekanne

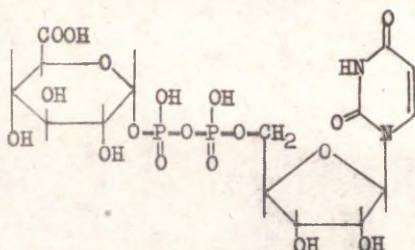


3. UDP-glükoos. Kannab üle glükoosi jääke (näit. glükogeeni sünteesil). Te-

kib UTP ja glükoos-1-P reaktsioonis:
 $\text{UTP} + \text{glükoos-1-P} \rightarrow \text{UDP-glükoos} + \text{PPi}$

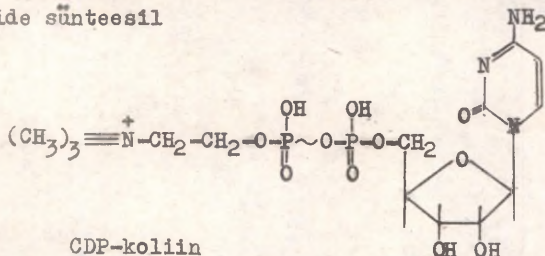


4. UDP-glükuronaat. Kannab üle glükuroonhappejääke (näit. toksiliste ühendite kahjutukstegemisel)



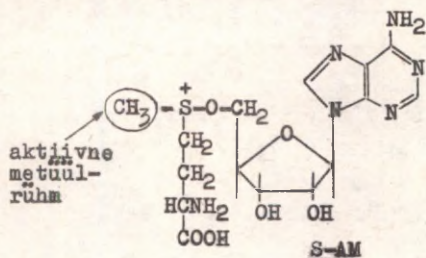
UDP-glükuroonhape

5. CDP-koliin. Töötab fosfokoliini ülekandjana fosfolipiidide sünteesil

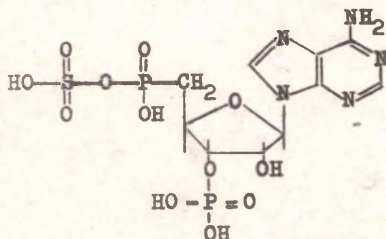


CDP-koliin

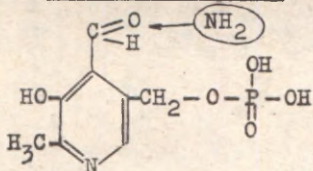
6. S-adenosüülmetsioniin (S-AM). Varustab mitmeid sünteesi (koliin, kreatiin, vitamiin B₁₂ jt.) metioniinist pärit aktiivsete metüülrühmadega.



7. 3'-fosfoadenosiin-5-fosfosulfaat (PAPS). Aktiivsete sulfaatgruppide ülekandja ja mitmetes sünteesides.



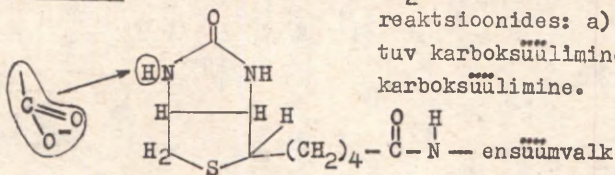
8. Püridoksaalfosfaat. Kujutab endast vitamiin B₆ fosforü-



püridoksaalfosfaat

leeritud derivaati, mis osaleb aminorühma ülekandjana transaminimisel ja AH-te dekarboksülimisel.

9. Biotiin. Töötab aktiivse CO₂ ülekandjana kahte tüüpi



biotiin-ensüüm

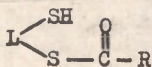
reaktsioonides: a) ATP-st sõltuv karboksüülimine; b) transkarboksüülimine.

10. Monooside fosfaatestrid. Kannavad üle fosfaatjääke ning nende tähtsamad esindajad on glükoos-1-P, glükoos-6-P, fruktoos-1-P ja fruktoos-1,6-diP.

11. ATP jt. nukleosiidtrifosfaadid. Tsentraalseks on nende hulgas ATP, mis võib üle kanda: 1) fosforüüljääke ($X + \text{ATP} \rightleftharpoons X\text{-P} + \text{ADP}$); 2) pürofosfaatjääke ($\text{ATP} \xrightarrow{-\text{PPi}} \text{AMP}$) ja adenüülhappejääke ($\text{ATP} \xrightarrow{-\text{AMP}} \text{PPi}$).

12. Kobalamiidsed koensüümid. Kui vitamiini B₁₂ struktuuris asendub tsüaniidioon (CN⁻) adenosiini jäägiga, moodustub aktiivne Co - kobalamiid. Kobalamiidsed Co-d osalevad metüülühma (aga ka mõnede teiste ühesüsinikuliste jääkide) ülekandel.

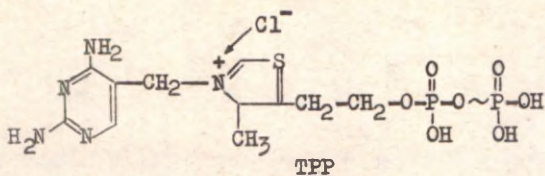
13. Lipohape. Osaleb α-ketohapete dekarboksülimisel moodustunud atsüülgruppide ülekandel.



S-atsüüllipohape

III Lüaaside koensüümid

Lüaaside koensüümidenä töötavad eespoolmainitud Co-dest püridoksaalfosfaat ja kobalamiidsed Co-d. Lisaks neile on lüaaside Co-ks ka TPP, mis osaleb α-ketohapete dekarboksülimisel ja aldehüüdrühmade ülekandel. TPP on vitamiin B₁ pürofosfoester.



IV Isomeraaside koensüümid

Isomeraaside Co-deks on kobalamiidsed Co-d (osalevad COOH-rühma ümberpaigutumisel) ja UDP-glükoos ning UDP-galaktoos (osalevad monooside isomeriseerumisel).

V Süntetaaside (ligaaside) koensüümid

Süntetaaside Co-dena töötavad need Co-d, mis on võimelised üle kandma radikaale ja rühmi (biotiin, UDP-glükoos, FH₄, kobalamiidsed koensüümid jt.). Tinglikult võiks siia kuuluda ka t-RNA, mis ensüümi aminoatsüül-t-RNA-süntetaas koosseisus osaleb aminohappejääkide ülekandjana valgu sünteesis.

Teadmiste kontroll

1. Selgitage kofaktorite mõistet.
2. Millised vitamiinid esinevad koensüümide koostises?
3. Omandada koensüümide klassifikatsioon.

Kirjandus

1. Tohver V., "Üldine biokeemia", Tln., 1977, lk. 239-253.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., "Биологическая химия", 1983, lk. 123-124.
3. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, lk. 129-143.
4. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 8

Teema: HORMONAALNE REGULATSIOON, HORMOONIDE KVALITATIIVNE JA KVANTITATIIVNE MÄÄRAMINE

Teadmiste algtaase:

1. Aminohapete, peptiidide, valkude ja steroidide mõisted.
2. Sisesekretsiooni ja endokriinsete näärmete mõisted. Endokriinsete näärmete talitluse häired.
3. Ekso- ja endogeensed bioaktiivsed ühendid.

Üldmõisted. Hormoonide ja hormonaalse regulatsiooni probleemid kuuluvad endokrinoloogia valdkonda, mis uurib hormoonide

keemilist struktuuri, struktuuri ja aktiivsuse vahelisi seoseid, hormoonide toimemehhanismi ning endokriinsete süsteemide füsioloogilisi ja patoloogilisi aspekte. Hormoonide alases kirjanduses eristatakse: a) hormoone (bioaktiivsed endogeensed ained, mida kesknärvisüsteemi kontrolli all sünteesitakse endokriinsetes näärmetes ning mis reguleerivad metaboolseid protsesse ja füsioloogilisi funktsioone); b) hormoonide e. koehormoone e. parahormoone (nn. hormoonilaadsed ained, mida toodavad mitmete kudede spetsialiseerunud rakud ja millel on samuti regulatoorne toime metaboolsetele protsessidele ja füsioloogilistele funktsioonidele). Selline liigitamine on väga tinglik, sest tsentraalne endokriinne süsteem (endokriinsed näärmed) ja difuusne endokriinne süsteem (mitmete kudede spetsialiseerunud endokriinsed rakud) kujutab endast tegelikult ühtset, terviklikku süsteemi.

Hormoonide klassifikatsioon. Kuna hormoonide keemiline loomus on väga mitmekesine, on levinuim nende klassifikatsioon, mis arvestab hormoonide keemilist struktuuri ning võtab aluseks ka endokriinsed näärmed. Selle klassifikatsiooni kohaselt jagunevad hormoonid järgmiselt (vt. tabel 4).

Hormonoidide hulka kuuluvad: hepariin, hirudiin, kininid, angiotensiinid, biogeensed amiinid (dofamiin, noradrenaliin, adrenaliin, histamiin, serotonin, γ -aminovõihape), prostaglandiinid (vt. vastav loeng).

Hormoonide bioloogiline iseloomustus. Hormoonid on üldiselt kõrge bioloogilise aktiivsusega (toimivad juba kontsentratsiooniga 10^{-9} - 10^{-12} g) bioregulaatorid, mis mõjutavad metaboolseid protsesse ensüümide kaudu järgmistel viisidel: a) kiire mõju (muutub vastava ensüümi(de) aktiivsus); b) aeglane mõju (muutub vastavate ensüümide de novo sünteesi kiirus). Hormoonid erinevad üksteisest toime tüübi ja spetsiifilisuse poolest. Näit., kilpnäärme hormoonidel on universaalne toime, s.t. nad mõjuvad praktiliselt kõikidele rakkudele; parathormoon mõjub aga eeskätt luukoe ja neerude rakkudele; neerupealiste hormoonid - glükokortikoidid ja katehoolamiinid suurendavad organismi vastupanuvõimet mitmesugustele teguritele, s.t. et need hormoonid reguleerivad adaptiivseid protsesse.

Neurohumoraalne regulatsioon. Hormoonide, hormonoidide ja kesknärvisüsteemi (KNS) seoste puhul eristatakse kaasaajal kolme terminit: a) toime "endokriinne tee", s.o. hormoonide

Tabel 4

Hormooni nimi	Sümbol	Keemiline loomus	Toimekoht	Põhilised efektid antud toimekohas
1	2	3	4	5
<u>I Aminohappelise, peptiidse ja valgulise loomusega hormoonid</u>				
1. <u>Hüpotaalamuse faktorid (neurohormoonid)</u>		peptiidid	hüpofüüs	Hüpofüüsi hormoonide sekretsiooni regulatsioon
1.1. Liberiinid (releasing factors)	RH		hüpofüüs	Stimuleerivad hüpofüüsi hormoonide vabanemist (iga hüpofüüsi hormooni jaoks on vastav liberiin, näit. AKTH-RH, FSH-RH jne.)
1.2. Statiinid	RIH		hüpofüüs	Pidurdavad hüpofüüsi hormoonide vabanemist (kaasajaks on leitud kolm statiini: STH-RIH e. GH-RIH, MSH-RIH ja LTH-RIH e. Prol-RIH)
<u>2. Hüpopüüsi hormoonid</u>				
<u>2.1. Eessagara (adenohüpofüüsi) hormoonid</u>				
1) Somatotropiin (kasvuhormoon, somatotroopne hormoon)	STH GH	polüpeptiid	üldine	Anaboolse efektiga (stimuleerib valgu ja glükogeeni sünteesi lihastes, südamis ja luude kasvu)
			rasvkude	Lipiidide vabanemise ja lipiidide lõhustumise stimuleerimine
			pankreas	Mõjutab insuliini vabanemist
			magu	Stimuleerib gastriini eritumist
			maks, neerud	Mõjutab enda vahendaja somatomeediini sünteesi
			piimanääre	Stimuleerib piima sekretsiooni

1	2	3	4	5
2) Adrenokortikotropiin (adrenokortikotroopne hormoon)	AKTH	polüpeptiid	neerupealiste koorollusrasvkude pankreas seedetrakt maksaväli-sed koed	Stimuleerib kortikosteroidide sünteesi Stimuleerib rasvhapete vabanemist Mõjutab insuliini vabanemist Tugevdab HCl ja pepsiini sekretsiooni Tugevdab AH-te transporti rakku
3) Gonadotroopsed hormoonid (gonadotropiinid)				
a) Follitropiin (folliikulostimuleeriv hormoon)	FSH	glüko-proteiin	munasarjad seemnesarjad	Stimuleerib folliikulite arengut, östrogenide sekretsiooni ja ovulatsiooni (koos LH-ga) Stimuleerib spermatogeneesi
b) Luteiniseeruv hormoon (lutropiin, interstitsiaalseid rakke stimuleeriv hormoon)	LH (IRSH)	glüko-proteiin	munasarjad seemnesarjad	Stimuleerib folliikulite lõplikku küpsemist ja nende lõhustumist ning muundumist kollaskehaks. Mõjutab interstitsiaalsete rakkude arengut ja progesterooni sekretsiooni Stimuleerib interstitsiaalsete rakkude arengut ja testosterooni sekretsiooni
c) Luteotropiin (prolaktiin, laktotroopne hormoon)	LTH (Prol)	polüpeptiid	piimanäär kollaskeha hüpofüüs üldine	Stimuleerib arengut ja laktatsiooni Stimuleerib progesterooni sekretsiooni ja inhibeerib luteiniseerumist Pidurdab teiste gonadotroopsete hormoonide sekretsiooni Stimuleerib anaboolseid protsesse
4) Türeotropiin (türeotroopne hormoon)	TSH (TTH)	glüko-proteiin	kilpnäär	Stimuleerib kilpnäärme hormoonide sünteesi ja sekretsiooni. Stimuleerib glükolüüsi, Krebse tsükli, pentoosofosfaadi tsükli ja liitlipiidide sünteesi

1	2	3	4	5
			rasvkude	Stimuleerib lipolüüsi
5) Lipotroopsed hormoonid (lipotropiinid)	α -LPH β -LPH	polü- peptiidid	rasvkude	Stimuleerivad lipolüüsi
6) Endorfiinid (α -, β - ja γ -endor- fiinid)		peptiidid (nende läh- teühendiks on β -LPH)	hüpopüüs	β -endorfiin stimuleerib STH sekret- siooni
<u>2.2. Kesksagara (pars intermedia) hormoonid</u>				
1) Melanotropiinid (melanostimuleerivad hormoonid)	α -MSH β -MSH	peptiidid	melanofoor- sed rakud	Stimuleerivad naha pigmentatsiooni
			soolanaar- med (?)	Mõjuvad sekretoorsele funktsioonile (?)
<u>2.3. Tagasagara (neurohüpopüüs) hormoonid</u>				
1) Vasopressiin*		nona- peptiid	neerukana- likesed	Mõjutab vee reabsorptsiooni (antidiu- rees)
			silelihas- kude	Mõjutab perifeersete arterioolide ja kapillaaride ahenemist. Stimuleerib emaka ja seedetrakti kontraktsiooni ning piima väljutamist piimanäärdest.
			aju	Mõjutab kaitumisreaktsioone
2) Oksitotsiin*		nona- peptiid	silelihas- kude	Stimuleerib piima väljutamist ja emaka kontraktsiooni sunnitusel
			rasvkude	Stimuleerib glükoosi utilisatsiooni (insuliinitaoline efekt)
3) Kogeriin		polü- peptiid	seedetrak- ti lihased	Reguleerib seedetrakti peristaltikat

* tegelikult sünteesitakse need hormoonid hüpotaalamuses, kust nad sekreteeritakse hüpopüüsi

1	2	3	4	5
3. <u>Epifüüsi (käbinäärme) hormoonid</u>				
1) Melatoniin	N-atsetüül-5-metoksü-trüptamiin (Trp derivaat)	melanofoorsed rakud	Reguleerib	naha pigmentatsiooni
		hüpotagla-mus, hüpo-fuus	Mõjutab biorütme. Pidurdab LH vabanemist ja toimet (pidurdab noorloomadel sugufunktsioonide arengut)	
4. <u>Kilpnäärme hormoonid</u>				
1) Türeoglobuliin (joodtüreoglobuliin)	glüko-proteiin	Türeoglobuliin ei oma hormonaalset aktiivsust ja on tegelikult jodeeritud türosiini jääke sisaldav valk. Nende jääkide kondenseerumine viib T ₃ ja T ₄ moodustumisele türeoglobuliini koosseisus. T ₃ ja T ₄ vabanevad türeoglobuliini proteolüüsil		
2) 3,5,3'-trijood-türoniin	T ₃	Tyr derivaat	Üldine	Kiirendab metabolismi (eriti redoks-reaktsioone)
3) 3,5,3',5'-tetrajood-türoniin	T ₄	Tyr derivaat	Üldine	Kiirendab metabolismi (eriti redoks-reaktsioone)
4) 3,3'-dijoodtüroniin			Üldine	Kiirendab metabolismi (eriti redoks-reaktsioone)
5) Kaltsitoniin (türeokaltsitoniin)		polü-peptiid	skelett	Reguleerib Ca ja P metabolismi
5. <u>Kõrvalkilpnäärme hormoonid</u>				
1) Paratüreoidiinid (parathormoonid I, II, III)	PTH	valgud, mis erinevad ainult ΔH-te järjestuselt	skelett, neerud, seedetrakt	Reguleerivad Ca ja P metabolismi
2) Kaltsitoniin (türeokaltsitoniin)		polü-peptiid	skelett	Reguleerib Ca ja P metabolismi (teatud mõttes PTH vastand)

	1	2	3	4	5
6. <u>Tuumuse (harknäärme) hormoonid</u>					
1) Kaltsitoniin			polü-peptiid	skelett	Reguleerib Ca ja P metabolismi
2) Tümosiin			polü-peptiid	lüm-fotsüüdid	Stimuleerivad lümfooesi. Reguleerivad rakulist immunitseti. Kiirendavad immunoloogiliselt kopsude lümfootsüütide valmimist
3) Tümosiin α_1			polü-peptiid		
4) Homeostaatiline tüumuse hormoon	HTH		glükopeptiid		
5) Tuumuse humoraalne faktor	THF		polü-peptiid		
6) Tümoepetiinid I, II			polü-peptiidid		
7) Lümfostimuleeriv hormoon	LSH _h		polü-peptiid		
8) Lümfostimuleeriv hormoon	LSH _r		polü-peptiid		
9) Tümosteriin			steroidilaadne		
7. <u>Pankrease hormoonid</u>					
1) Insuliin			valk	üldine rasvkude	Stimuleerib SV utilisatsiooni ja valkude (s.h. ka membraansete) sünteesi
				maks lihased	Mõjutab lipolüüsi ja glükoosi metabolismi
				maks	Stimuleerib lipogeneesi ja glükolüüsi
				Stimuleerib glükoosi utilisatsiooni	
2) Glükagoon			polü-peptiid	maks	Stimuleerib glükogeeni lõhustumist glükoosiks (glükogenolüüsi)
				rasvkude	Mõjutab triglütseriidide lõhustumist
				neerud	Kiirendab vereringet ja filtratsiooni

1	2	3	4	5
3) Pankrease polüpeptiid		polü-peptiid	pankreas maks	Tõstab ensüümide sekretsiooni Intensiivistab glükogenoluusi
4) Somatostatiin		peptiid	pankreas seede- trakt ? rasvkude adenohüpofüüs	Pidurdab glükagooni sekretsiooni Pidurdab gastriini ja sekretiini sekret- siooni? Mõjutab lipiidide vabanemist Pidurdab STH vabanemist
8. <u>Seedetrakti hormoonid</u>				
1) Gastriinid		peptiidid	magu	Reguleerivad kontraktsiooni ning HCl ja pepsini sekretsiooni
2) Sekretiin		peptiid	pankreas	Reguleerib pankrease nõre elektrolüütide sekretsiooni
3) Koletsüstokiniin- pankreoziin		peptiid	pankreas sapipõis	Reguleerib pankrease ensüümide sekretsio- oni Reguleerib sapi väljutamist
4) Motiliin		peptiid	seedetrakt	?
5) Enterogastroon		peptiid	magu	Pidurdab HCl sekretsiooni
6) Vasoaktiivne intesti- naalne peptiid	VIP	peptiid	seedetrakt	Reguleerib seedetrakti tööd
7) Gastrointestinaalne inhibeeriv peptiid	GIP	peptiid	seedetrakt	Reguleerib seedetrakti tööd
8) AKTH		peptiid	adenohüpofüüs seedetrakt	Pidurdab somatostatiini sekretsiooni Stimuleerib kataboolseid protsesse
9) STH		peptiid	seedetrakt	Stimuleerib anaboolseid protsesse
10) Endorfiinid		peptiidid	seedetrakt	?

1	2	3	4	5
<u>9. Neerupealiste säsiolluse hormoonid</u>				
1) Adrenaliin	Tyr derivaat	maks, lihased sile- lihased sudame- lihase arterioo- laid	Stimuleerib glükogenolüüsi (insuliini antagonist) Stimuleerib kontraktsiooni Reguleerib kokkutõmbumise sagedust. Inotropne efekt Reguleerib vererõhku	
2) Noradrenaliin	Tyr derivaat	rasvkude üldine maks, lihased rasvkude arterioo- laid üldine	Stimuleerib lipolüüsi Suurendab O_2 tarbimist Stimuleerib glükogenosüüsi Stimuleerib lipolüüsi Reguleerib lihaste kokkutõmbumist Tõstab O_2 tarbimist	
<u>10. Platsenta hormoonid</u>				
1) Relaksiin	polü- peptiid	hääbene- liidus	Reguleerib lihastoonust (sünnitustegevus)	
2) Prol}			Toime efektid on samased hüpofüüsi AKTH ja Prol-ga	
3) AKTH}				
4) Platsenta gonadotroopne hormoon (kõriongonadotropiin)	CG	glükoproteiin	Toimekohad ja efektid on analoogilised (kuid mitte identsed) hüpofüüsi LH ja FSH-ga. Täiendab LH efekti kollaskeha kasvu stimuleerimises raseduse ajal. Inimese kõriongonadotropiini sümbol on HCG	

1	2	3	4	5
5) Kõrionmammotropiin (somatomammotropiin, somatotroopne hormoon)	CS	polü- peptiid (AH järjes- tus on sar- nane STH)	Funktsioonid on sarnased hüpofüüsi STH-le	
6) Progesteroon ja mõningad östrogeenid (need on steroidised hormoonid, vt. suguhormoonid)				

II Steroidhormoonid (struktuurseks aluseks on tsüklopentaanoperhüdrafenantreen)

1. Neerupealiste koorolluse hormoonid (kortikosteroidid)

1.1. Glükokortikoidid

1) Kortikosteroon

2) Kortisool
(hüdrokortisoon)

3) Kortisoon

4) 11-dehüdrokortiko-
steroon

5) 11-desoksükortisool

17-hüdrok-
sükortiko-
steroon

17-hüdrok-
sü-11-okso-
kortiko-
steroon

11-oksokor-
tikosteroon

17-hüdrok-
sü-11-de-
hüdroksü-
kortikoste-
roon

üldine

Mõjuvad peamiselt süsivesikute (aga ka valkude ja lipiidide) metabolismile. Osalevad organismi homeostaasi säilitamises. Reguleerivad immuniteedi ja infektsiooniresistentsust. On seotud organismi ülitundlikkusega.

1	2	3	4	5
<u>1.2. Mineralokortikoidid</u>				
1) 11-desoksükortikosteroon		11-dehüdroksükortikosteroon	} üldine	} Reguleerivad vee ja soolade metabolismi. On seotud põletike tekkeprotsessidega
2) Aldosteron				
3) 18-oksü-11-desoksükortikosteroon		18-hüdroksü-11-dehüdroksükortikosteroon		
<u>2. Suguhormoonid</u>				
<u>2.1. Androgeenid (meessuguhormoonid)</u>				
Neid hormone sünteesitakse seemnesarjades				
1) Testosteron			} üldine	} Reguleerivad arengut ja normaalset funktsioneerimist
2) Dihüdrotestosteron		17 β -hüdroksü-5 α -androstaan-3-oon		
3) Androsteronid* (5 α - ja 5 β -androsteron)			üldine	Reguleerivad sekundaarsete sugutunnuste arengut ja spermatogeneesi. Evivad anaboolset toimet

* kujutavad endast testosterooni metaboliite

1	2	3	4	5
4) Dehüdroisoandrosteroon*		3-hüdroksü-5-androsteen-17-oon	üldine	Reguleerivad sekundaarsete sugutunnuste arengut ja spermatogeneesi. Elivad anaboolset toimet
5) Adrenosteroon*				
6) 4-androsteen-3,17-dioon*				
7) 11 β -hüdroksü-4-androsteen-3,17-dioon*				
8) 17 α -hüdroksüprogesteroon*				

2.2. Östrogeenid (naissuguhormoonid)

Neid hormone sünteesitakse munasarjades

1) Östroon (follikuliin)**	üldine	Reguleerivad sekundaarsete sugutunnuste arengut
2) β -östradiool**		Reguleerivad arengut ja normaalset tsüklilist funktsioneerimist
3) Östriool**		Reguleerivad arengut ja funktsioneerimist
4) Progesteron*** (luteosteron)	emakas	Reguleerib viljastatud munaraku ettevalmistamist implantatsiooniks
	piimanaare	Stimuleerib naarmet arengut

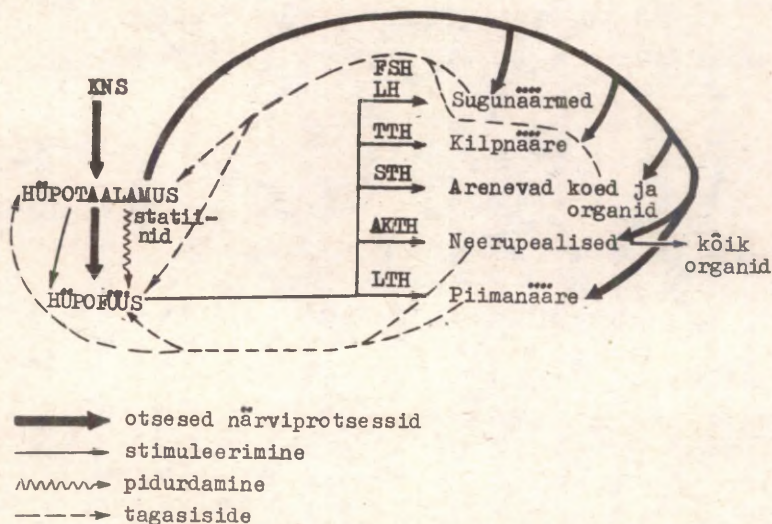
* sünteesitakse vahesel määral ka neerupealiste koorolluses, kuid siis on nende toime ~30 korda nõrgem

** sünteesitakse vahesel määral ka neerupealiste koorolluses

*** sünteesitakse vahesel määral ka platsentas ja kollaskehjas

mõju metaboolsetele protsessidele vere ja lümfi vahendusel, nimetatakse ka humoraalseks teeks või toimeks, b) toime "parakriinne tee", s.o. ühes rakus toodetud hormooniidi otse+ne mõju naaberrakkudele, c) regulatsiooni "neurokriinne tee", s.o. närvisüsteemi kaudu toimuv regulatsioon. Kuna kõik need teed on omavahel tihedalt seotud, siis elutegevuse ühtset regulatsioonisüsteemi nimetatakse neurohumoraalseks e. neurohormonaalseks regulatsiooniks. Närvisüsteemi ja endokriinse süsteemi intiimset funktsionaalset seost tõestab ka see, et närviimpulsi ülekanne ühelt neuronilt teisele (või neuronilt efektorile) toimub bioaktiivsete ühendite (mediatorite) abil.

Nagu nähtub joon. 12, iseloomustavad neurohumoraalset regulatsiooni järgmised iseärasused: a) toime teatud dubleerimine (organi tegevust mõjutavad nii närviimpulss kui ka vastavad hormoonid), b) hüpofüüs omab teiste endokriinsete näärmete tegevust reguleerivat funktsiooni, c) eksisteerit tagasiside printsiip (hormoon, toimides hüpofüüsile ja hüpotaalamusele, mõjutab hüpotaalamuse faktorite sünteesi ja hü-



Joon. 12. Neurohumoraalse regulatsiooni üldistatud skeem

poftuusi tegevust). Ülaltoodust järeldub, et hormoonid on teatud keemilised vahendajad, mis kannavad närviimpulsis oleva informatsiooni üle rakuprotsessidele seostudes vastavate retseptoritega (vt. hormoonide toimemehhanismi loeng).

Hormoonide määramiseks kasutatakse mitmeid võtteid:

- 1) värvusreaktsioone, 2) fluorestsentsil põhinevaid meetodeid, 3) radioimmunoloogilisi meetodeid.

Teadmiste kontroll

1. Mida nimetatakse hormoonideks (hormonoidideks)? Mida tähendavad mõisted "endokriinne", "parakriinne" ja "neurokriinne"?
2. Omandada hormoonide klassifikatsioon.
3. Mis on neurohumoraalne regulatsioon? Nimetage tema põhi-jooned.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коронкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, lk. 222-264.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, lk. 370-411.
3. Loengute konspekt.

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 9

Teema: METABOLISMI UURIMISE MEETODID. TOITUMISE JA SEEDIMISE BIOKEEMIA

Üldmõisted. Dünaamiline biokeemia opereerib mitmesuguste mõistetega, millest olulisemad on järgmised.

1. Üldine ainevahetus. Selle all mõistetakse toitumist, seedimist, rakusisest metabolismi ja lõppproduktide moodustumist ning eritumist organismist.
2. Väline ainevahetus. See on üldise ainevahetuse osa, mis hõlmab toitumist, seedimist, imendumist, ainete transporti biovedelike abil ja lõppproduktide eritumist.
3. Rakusisene e. intermediaarne ainevahetus e. metabolism kitsamas mõttes. Hõlmab kõiki rakus toimuvaid metaboolseid radu ja keemilisi üksikreaktsioone, mis on seotud kas ainete lagunemisega (katabolism) või nende biosünteesiga (anabolism). Moodustuvaid vahetühendeid nimetatakse metaboliitideks e. intermediaatideks.
4. Metaboolne rada. Üksikreaktsioonide jada, mille käigus

lähteühend e. lähtemetaboliit muundub lõppühendiks e. lõppmetaboliidiks. Näit. glükolüüs, milles glükoos muundub laktaadiks; glükoneogenees, milles laktaadist ja reast AH-st sünteesitakse glükoos.

5. Tsentraalne metaboolne rada. Põhirada, mis esineb paljudes organismides, elundites ja kudedes. Näit. glükolüüs, Krebssi tsükkel jt.

6. Spetsiifiline metaboolne rada. Rada, mis eksisteerib ainult teatud organismides, elundites või kudedes ning on reeglina seotud mingi spetsiifilise funktsiooniga. Näit. karbamiidi süntees imetajate maksarakkudes, mis on seotud ammoniagi neutraliseerimisega.

7. Energiavahetus. Kuna ainevahetusega metabolismi käigus kaasneb alati ka energia muut, siis on energiavahetus lahutamatu üldisest ainevahetusest. Metaboolsed rajad ja reaktsioonid on alati seotud kas energia tootmisega ja tema akumulatsiooniga või energia tarbimisega.

8. Valkude, süsivesikute, lipiidide, nukleiinhapete jne, metabolism. Selline liigendamine on puhtpraktiline ja didaktiline. Tegelikult organismis moodustavad nad vastastikuste üleminekute ja seoste tõttu ühtse terviku.

Üldise ainevahetuse uurimise meetodid. Üldine ainevahetus täidab järgmisi põhifunktsioone: 1) energia ammutamine väliskeskkonnast päikeseenergia või orgaaniliste ühendite keemilise energia kujul; 2) eksogeensete ainete muundamine organismi makromolekulide struktuurseteks elementideks, "ehituskivideks"; 3) funktsionaalsete ja struktuursete raku makromolekulide süntees monomeeridest; 4) "vananenud" rakkude komponentide lõhustamine, energia tootmine ja lõppproduktide moodustumine.

Kooskõlas üldise ainevahetuse liigendamisega võib uurimismeetodeid jagada järgmiselt.

1. Välise ainevahetuse uurimismeetodid. Kuuluvad kaasajal rohkem füsioloogia valdkonda (vt. füsioloogia kursust).

a) Ainete bilansi määramine. Peegeldab organismi üldseisundit ja ainete muundumise kiirust organismis.

b) Energiabilansi määramine. Võimaldab hinnata energeetiliselt muutusi organismis, võrreldes toiduga sisestatud ja organismist eritunud energia hulki. Arvestatakse, et täielikul oksüdatsioonil organismis annab 1 g rasva 38,8 kJ (9,3 kcal).

1 g valku 18,0 kJ (4,3 kcal) ja 1 g süsivesikuid 17,2 kJ (4,1 kcal). NB! Toitainete tegelik energeetiline efekt ei seisne mitte nende lõhustumisel toimivas energiamuudus, vaid toitaine ühe molekuli lõhustumisel moodustuva ATP molekulide arvus.

c) Hingamiskoeffitsiendi (RQ) määramine. RQ on teatud ajaühikus eritatud CO_2 ja tarbitud O_2 molaarne suhe. Ta võimaldab hinnata konkreetsete toitainete muundumist ja energia tootmist organismis antud tingimustes. Näit. kui $\text{RQ} = 1$, siis kogu energia (soojus) tekib ainult süsivesikute oksüdatsiooni arvel; kui $\text{RQ} = 0,85$ siis moodustuvast soojusest langeb 84% süsivesikute oksüdeerumise arvele ja 16% lipiidide oksüdeerumise arvele.

d) Ainete saatus ja jaotumise määramine organismis (kasutatakse märgistatud aatomeid).

2. Rakusisese metabolismi uurimismeetodid. Neid võib jagada kolme rühma: a) uuringud tervikliku organismi tasemel. Siia kuuluvad koormuskatsed, isotoopide meetod, kaasasündinud metabolismi häirete uurimine, katsed toitesegudega, auksotroofsete mutantide meetod jt.; b) analüütilis-desintegreerivad meetodid. Põhinevad sellel, et metabolismi uuritakse terviklikust organismist isoleeritud elundite, koelõikude, rakkude, homogenaatide, raku subtsellulaarsete fraktsioonide ja individuaalsete ensüümide tasemel; c) sünteesivad meetodid. Üldistavad eeltoodud meetoditega saadud faktid terviklikuks metaboolseks protsessiks, kasutades mudeleid, abstraktseid süsteeme ja kaasajal ka arvutustehnikat (lähemalt käsitatakse metabolismi uurimismeetodeid loengul). Lõpliku vastuse antud metaboolsete protsesside kulgemise, regulatsiooni ja vastastikuste seoste kohta annab kõigi uurimismeetodite poolt kogutud informatsiooni üldistamine.

Inimtoidu koostis. Põhitoidained. Toitainete põhifunktsioonidest (energeetiline, struktuurne e. plastiline, bioregulaatorite moodustumine jt.) tuleneb, et häireteta metabolismi tagamine on seotud ka organismi ratsionaalse toitumisega. Järelikult on üheks biokeemia haruks ka toitumise biokeemia, mis uurib antud toitaine funktsiooni, tema liia- või puudusest sugenevate häirete loomust ning tekkemehhanismi, toitainete essentsiaalsust ja asendatavust.

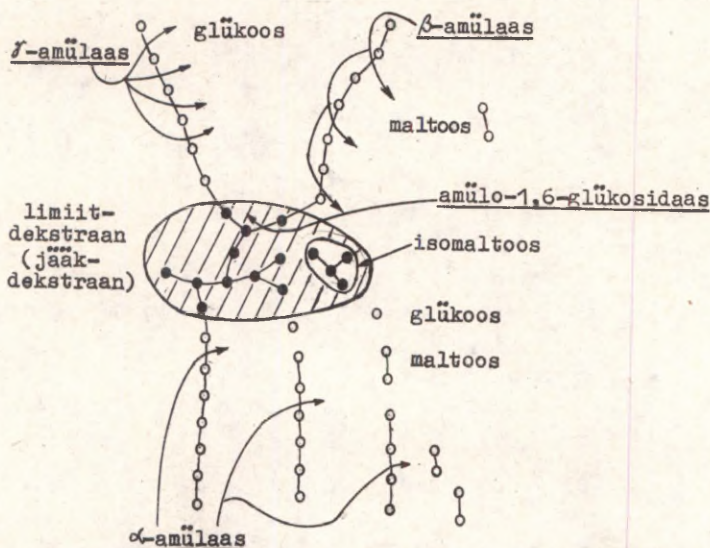
Inimtoidu koostises leiduvaid organismi elutegevuseks vajalikke komponente võib liigendada: 1) keemilise loomuse järgi: a) orgaanilised - süsivesikud, lipiidid, valgud, vitamiinid; b) anorgaanilised - vesi, mineraalained, mikroelemendid; 2) kvantitatiivse sisalduse alusel: a) põhilised - süsivesikud, lipiidid, valgud, mineraalained, vesi; b) minoorseid - vitamiinid, mikroelemendid; 3) bioloogilise rolli alusel: a) asendatavad - süsivesikud, lipiidid (nukleinhapete sisaldus toidus ei ole vajalik); b) asendamatud - valgud (asendamatu ΔH -te tõttu), enamik vitamiine, rida mineraalaineid, mikroelemendid.

Levinuim on toitainete liigendamine põhilisteks ja minoorseteks. Põhitoidainete ööpäevane vajadus inimorganismi jaoks on järgmine: süsivesikuid - umbes 500 g; loomseid ja taimseid lipiide kokku - 60-80 g; valke - 110 kuni 120 g; mineraalaineid - 10 kuni 15 g; vett - umbes 40 g 1 kg kehakaalu kohta (imikutel on veevajadus 3-4 korda suurem).

Toitainete seedimine ja imendumine. Üldise ainevahetuse esimeseks etapiks on polümeersete orgaaniliste toitainete lõhustamine (hüdrolüüs) seedetraktis monomeerideks suhteliselt mittespetsiifiliste ensüümide toimel. Suhteline mittespetsiifilisus on vajalik selleks, et seedetrakt suudaks adekvaatselt reageerida toitainete koostise varieerumistele. Toidu komponentide seedimise ja imendumise normaalseks kulgemiseks on vajalik ka toidu tasakaalustatus, st. vajalikud komponendid peavad toidus sisalduma kindlates omavahelistes vahekordades.

1. Süsivesikute (SV-te) seedimine (hüdrolüüs). Toidu põhiline SV on tärklis. Peale tärklise on toidus veel glükogeeni, sahharoosi, laktoosi, fruktoosi, tselluloosi, pentoose. a) Seedimine suuõõnes. Algab tärklise (glükogeeni) sisemiste α -1,4-glükosiidsidemete hüdrolüüs sülje α -amülaasi (endaamülaas) toimel. Sülje α -amülaas on glükoproteiinsete isoensüümide segu pH-optimumiga 6,8-7,3. Nende aktiivses tsentris on Ca^{2+} ja neid aktiveerivad monovalentsed anioonid (eriti Cl^{-}). Seedetraktis töötavad ka β -amülaas, mis eemaldab tärklise (dekstriinide, glükogeeni) mitteredutseerivast otsast maltoosijääke, ning γ -amülaas, mis eemaldab mitteredutseerivast otsast glükoosijääke. Põhiliselt moodus-

tuvad dekstriinid, sest toit on suus lühikest aega, vähesel määral vabaneb ka maltoosi ja glükoosi (vt. joon. 13).

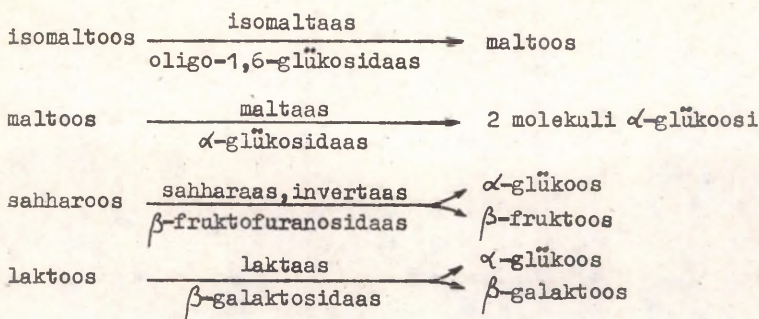


Joon. 13. Tärklise (glükogeeni) hüdrolyüs

b) Seedimine maos. Happelise maomahla toimel süljeensüümide toime pärsitakse, mistõttu SV-te seedimist maos praktiliselt ei toimu.

c) Seedimine peensooles. See on SV-te seedimise põhikoht, kus peale maosisu neutraliseerimist pankrease bikarbonaatidega hüdrolyüsitakse tärklis, glükogeen, dekstriinid ja amülopektiin peamiselt maltoosiks järgmiste ensüümide koostöös: 1) pankrease α-amülaas, mis lõpetab sülje α-amülaasi poolt alustatud hüdrolyüsi. Ka pankrease α-amülaas on tõenäoliselt isoensüümide segu (pH-optimum 7,1), mida aktiveerib Cl^- ja stabiliseerib Ca^{2+} . Suudab lõhkuda ka sülje α-amülaasi poolt lõhkumata jäänud tärklis; 2) soolenõre amülo-1,6-glükosidaasid ja oligo-1,6-glükosidaasid - lõhuvad α-1,6-glükosiidsidemeid, mis asuvad hargnemispunktidest, s.t. teevad võimalikuks α-amülaasi edasise toime.

Kelneva seedimise käigus tekkinud (või toidus juba olemasolevad) oligosahhariidid hüdrolyüsitakse järgmiselt:



Joon. 14. Oligosahhariidide hüdroolüüsi skeem

Kõigi loetletud ensüümide järjestatud toime tulemusena hüdroolüüsitakse toidu SV-d (v.a. tselluloos) monoosideks, millest põhiosa moodustab glükoos, kuid tekib ka fruktoosi, galaktoosi jt. monoose. Eristatakse seejuures: a) õõneseedimist (s.o. seedimine soole valendikus) ja b) membraanseedimist (s.o. õõneseedimisel lõhustumata jäänud polüooside, aga ka maltoosi, sahharoosi, laktoosi seedumine enterotsüütide pinnal, täpsemalt enterotsüütide mikrohattude ehk nn. hariäärise pinnal olevas võrkjas niidistikus - glükokaalüksis).

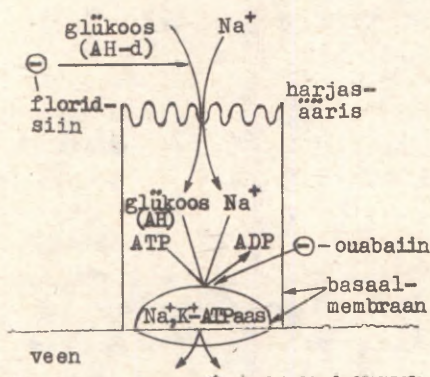
2. Süsivesikute imendumine (resorptsioon). Imendumine kujutab endast protsessi, mille käigus ühendid viiakse läbi seedetrakti limaskestast epiteeli verre ja lümf. Imendumine läbi peensoole limaskestast epiteelirakkude (enterotsüütide) toimub difusiooni ja aktiivse transpordi teel (vt. ainete transpordi liikide loeng).

Monosahhariidide imendumine on seotud mineraalainete (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} jt.) imendumisega, mille aluseks on aktiivne transport. Nii näiteks viiakse Na^+ aktiivselt epiteelirakku harjasäärisest oleva transportsüsteemi abil (vt. joon 15), Cl^- järgneb neile elektrilaengu tasakaaluseisundi häirimise tõttu.

Monooside imendumist iseloomustavad järgmised seaduspärasused: 1) imendumisvõimelised on ainult monoosid (näit. parenteraalselt manustatud disahhariidid ei lülitu metabolismi ja erituvad uriiniga); 2) monooside imendumiskiirused (%-des) on erinevad: D-glükoos - 100, d-galaktoos - 110, -

D-fruktoos - 43, D-mannoos - 19, L-ksüloos - 15, L-arabinoos - 9); 3) mannoos, ksüloos ja arabinoos imenduvad difusiooni teel, teised monoosid imenduvad ATP energiat nõudva aktiivse transpordi teel (vt. joon. 15); 4) enterotsüütides toimub imendumise käigus teiste heksooside üleminek glükoosiks.

Monooside (aga ka aminohapete) aktiivse transpordi mehhanismi võib kujutada järgmiselt (joonis 15): süsivesikud ja Na^+ viiakse üheaegselt soole valendikust enterotsüüti. Glükoosid floridsiin inhibeerib SV-te ülekannet, kuid ei inhibeeri Na^+ ülekannet, st. Na^+ ülekanne rakku jätkub. Basaal-



Joon. 15. Monooside (aminohapete) imendumise skeem

membraanis olev $\text{Na}, \text{K}-\text{ATPase}$ eemaldab rakust Na^+ liia, millega kaasneb ka glükoosi ülekanne kapillaaride verre, luues glükoosi transpordiks vajaliku Na -gradiendi (soole valendikust enterotsüüti) ATP energia arvel. $\text{Na}, \text{K}-\text{ATPase}$ si täpne roll glükoosi ülekandes läbi basaalmembraani pole selge. Südameglükoosid ouabain, mis spetsiifiliselt inhibeerib $\text{Na}, \text{K}-\text{ATPase}$ (ei teki Na -gradienti), inhibeerib ka monoo-

side ja ΔH -te aktiivset transporti.

Imendunud monooside saatus. Kuna toidu põhiline SV on tärk-
lis, siis moodustab imendunud monooside põhimassi glükoos, mis järgnevalt satub värativeeni kaudu maksa ning fosforüleeritakse glükoos-6-P-ks, mida kasutatakse glükogeeni sünteesil või lülitatakse metabolismi. Osa glükoosi läbib maksa muundumatult ja läheb vere vahendusel kudede tarbeks. Vähene osa glükoosi muundub imendumise käigus glükoos-1-P-ks, mis maksas muudetakse glükoos-6-P-ks. See osa galaktoosist ja fruktoosist, mis imendumisel pole glükoosiks muundunud, satub värativeeni kaudu maksa, kus nad lülitatakse glükoosi metabolismi radadesse.

Nii maksa kui ka teiste ekstrahepaatiliste kudede rakukudesse sisestub glükoos verest kergendatud difusiooni teel

(vt. transpordi liikide loeng).

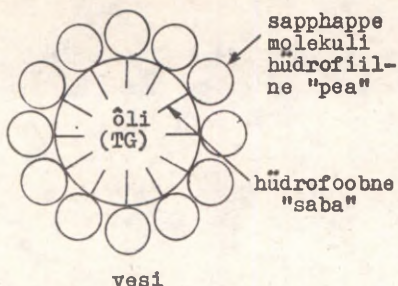
Tselluloosi tähtsus süsivesikute seedimises. Kuna inimorga-
nismi seedenõres pole β -1,4-glükosiidsidet hüdroolüüsivat
ensüümi, siis tselluloos ei seedu. Seedetrakti lõpuosas olev
mikrofloora teatud määral siiski lagundab tselluloosi, mille
tulemusena tekivad mitmed orgaanilised happed - etaanhape,
võihape, hüdroksüvõihape, piimhape jt., ning mitmed gaasilis-
ed produktid. Kuigi seega lõviosa tselluloosi ja hemitsellu-
loosi väljutatakse, on tselluloosil oluline roll seedimises,
kuna: 1) tselluloos loob seedetrakti pooltahke sisu, osaleb
faeces'e moodustumises ning stimuleerib soole peristaltikat,
2) bakteriaalsel lagundamisel tekkinud orgaanilised happed
on peale imendumist kasutatavad energeetiliste substraatidena.

Rohusööjate loomade maos leidub mikroorganisme, mis mu-
davad tselluloosi orgaanilisteks hapeteks. Viimaste kaudu
omastavadki antud organismid suurema osa tselluloosist.

3. Lipiidide seedimine (hüdroolüüs). Lipiidide seedimise ja
imendumise bioloogiline tähtsus seisneb hüdrofoobsete toidu-
lipiidide ja nende kaudu ka rasvlahustuvate vitamiinide ja
asendamatute rasvhapete omastamises. Toidulipiidide põhimas-
si (~99%) moodustavad seejuures triatsüülgütseriidid (TG)
e. neutraalrasvad.

Lipiidide seedimine ja imendumine hõlmab järgmisi aspek-
te: 1) emulgeerimine; 2) hüdroolüüs; 3) imendumine ja re-
sünteesis soole limaskestas; 4) transport vere vahendusel ning
jaotumine elundites ja kudedes.

Lipiidide emulgeerimine. Selles protsessis on olulised pind-
aktiivsed ained - emulgaatorid, mis vähendavad kahe faasi
(näit. õli ja vesi) vahelist pindpinevust ja tagavad peentil-
galise emulsiooni tekke. Lipiidide emulgaatoreid võib jagada
kahte rühma: a) hüdrofiilsed emulgaatorid; nende hulka kuu-
luvad sapphapped ja nende soolad kui tähtsaimad emulgaatorid,
ning valgud; b) lisafaktorid, mis soodustavad emulgaatorite
toimet (pankrease bikarbonaatidest tingitud leeliseline reakt-
sioon soole valendikus, rasvhapete soolad). Sapphapete soolad
(ka valgud) adsorbeeruvad rasvapiiskade pinnale nii, et hüd-
rofiilne molekuli "pea" jääb veekeskkonna poole. Kuna ala-
neb vee ja rasva vaheline pindpinevus, siis suured rasvatiil-
gad lagunevad õli/vesi tüüpi peenemulsiooniks, mis oluliselt



suurendab rasvatilgakeste üldist piirpinda. Kuna lipolüütilised ensüümid toimivad põhiliselt emulgeerunud lipiidide piirpinnal, siis mida paremini lipiidid on emulgeerunud, seda paremini nad hüdrolyüsuvad.

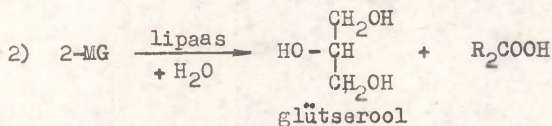
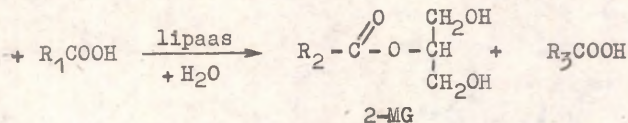
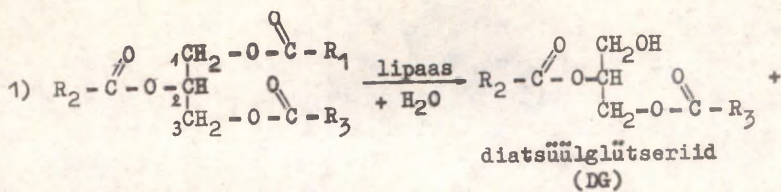
a) Seedimine suuõõnes. Kuna vastavad ensüümid puuduvad, siis siin lipiidide seedimist ei toimu.

b) Seedimine maos. Väikelastel (eriti rinnalastel) on mao-mahla pH umbes 5,0. Kuna mao lipaasi pH-optimum on samuti 5,0-7,3 ning piimarasv on piimavalgu kaseiini toimele hästi emulgeerunud, siis toimub väikelaste maos piimarasva oluline seedimine. Täiskasvanute maomahla pH on 1,5-2,5, mis pärsib toidu lipiidide emulgeerimist ja lipolüütiliste ensüümide aktiivsust. Siiski toimub maos toidu emulgeerunud lipiidide (piimarasv) ja lipoproteiinsete komplekside teatud hüdrolyüs, mis teeb neid kättesaadavamaks pankrease ensüümidele. Selle tulemusel tekib ka väheses koguses vabu rasvhappeid, mis, liikudes soolde, käituvad seal soolade vormis täiendavate emulgaatoritena.

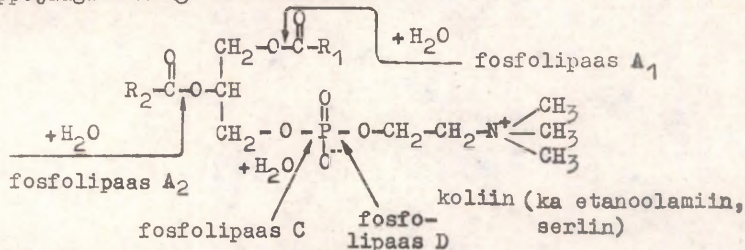
c) Seedimine peensooles. Siin leiab aset lipiidide põhiline hüdrolyüs (lipolüüs) vastavate tingimuste olemasolu tõttu:

- 1) CO_2 mullikesed, mis tekivad happelise maosisu neutraliseerimisel pankrease nõre ja soolenõre bikarbonaatidega, segavad toidumassi hästi läbi ja soodustavad emulgaatorite toimet;
- 2) toimub lipiidide põhiline emulgeerimine sapphapete toimele;
- 3) kolipaasi (kofaktor) ja sapphapete mõjul aktiveerub neutraalarasvade lipolüüsi keskne ensüüm - pankrease lipaas. Soole lipaas on vähema aktiivsusega ja ta hüdrolyüsib ainult monoatsüülglütseriide (MG).

Neutraalarasvade hüdrolyüs. TG täielik hüdrolyüs toimub pankrease lipaasi toimele järkjärguliselt: algul suhteliselt kiiresti hüdrolyüsitakse esterside asendites 1 ja 3 ning tekib 2-monoglütseriid (2-MG). Selle hüdrolyüs on aeglasem ja teda kasutatakse osaliselt ka TG-de resünteerimise soole limaskestas (vt. vastav loeng).



Fosfolipiidide (FL) hüdrolüüs. Nende hulk toidus on väike (~1% toidulipiididest) ning nad hüdrolüüsuvad vastavate fosfoliipaaside toimet glütserooliks, rasvhapeteks, fosforhappejäägiks ning lämmastikaluseks:



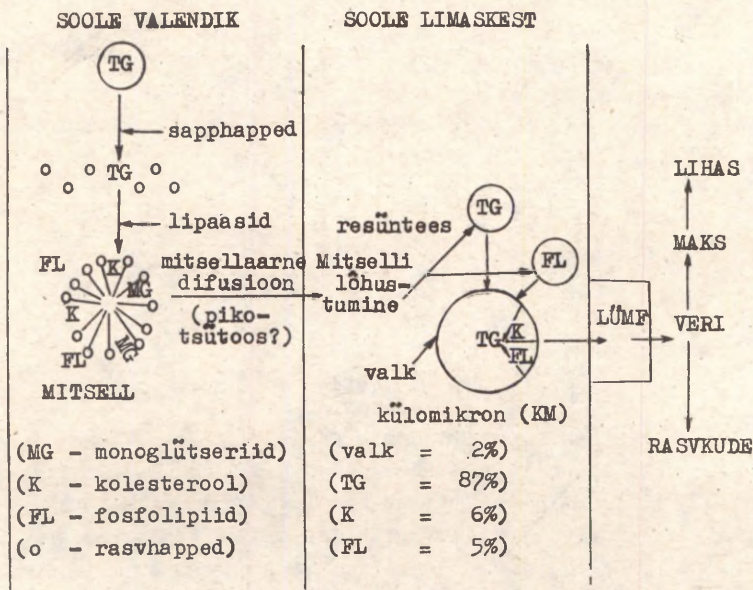
Kui rasvhappejääk eralduks ainult asendist 2 fosfoliipaas A₂ toimet, tekiks väga toksilised lüsofosfatidüülderivaadid, mis põhjustaksid erütrotsüütide hemolüüsi. Nii on maomürkide sattumisel verre nende kõrge aktiivsusega fosfoliipaas A₂ hemolüüsi põhjustajaks ja toksilise toime üheks komponendiks. Seedetraktis on lüsofosfatidüülderivaatide teke välditud fosfoliipaaside üheaegse toime tõttu.

Kolesteriidide hüdrolüüs. Toidu kolesteriidid, mida leidub toidu üldlipiidides alla 1%, hüdrolüüsitakse pankrease ja soole kolesterooli esteraaside toimet rasvhapeteks ja vabaks kolesterooliks.

4. Lipiidide imendumine. Lipiidide seedimisel tekivad vees lahustuvad ühendid (glütserool, H₃PO₄, fosfolipiidide N-alu-

sed), mis imenduvad vabalt, ning vees lahustumatud ühendid (rasvhapped, kolesterool, 2-MG, DG, vähesel määral ka seedumata kolesteriide ning TG), mille imendumine vajab abimehhanisme. Vees lahustumatud ühendid imenduvad järgmiselt:

- 1) rasvhapped (< 10 C) komplekseeruvad sapphapetega mitsellideks (vt. joon. 16);
- 2) pikaahelalised rasvhapped (> 10 C), 2-MG ja kolesterool komplekseeruvad sapphapetega mitsellideks, millede pinnale seostuvad seedumata fosfolipiidid;
- 3) seedimata jäänud TG-did imenduvad vähesel määral mikrotilkadena. Nende mõõtmed peavad olema alla $0,5 \mu\text{m}$. Kuigi see organismivõõras rasv ladestub rasvkoes, hüdrolyüsitakse ta alati enne kasutamist.



Joon. 16. Lipiidide seedimise ja imendumise üldskeem

Peensoole limaskestas toimub TG-de ja fosfolipiidide resünteerimine ning nad komplekseeruvad kolesterooli ja valguga spetsiifilisteks osakesteks - külmikroniteks, mis oma mõõtmete tõttu ei suuda tungida kapillaride verre, vaid nad difundeeruvad seedetrakti lümfatiselisse süsteemi, kust rinna lümfisüsteemi.

juha kaudu nad satuvad vereringesse. Külomikronite abil toimub eksogeensete TG-de, kolesterooli ja osaliselt ka FL-de transport peensoolest läbi lümfaatilise süsteemi verre (lipiidide transporti käsitletakse vastavas loengus).

5. Valkude seedimine (proteolüüs). Valkude seedimise bioloogiline funktsioon seisneb toiduvalkude hüdrolüüsimises AH-ks, mille käigus kaob toiduvalkude liigi- ja koespetsiifilisus (s.t. ka antigeensus) ning peale AH-te imendumist kindlustatakse vabade AH-te fondi täienemine. Toiduvalkude lõplik hüdrolüüs tagatakse proteolüütiliste ensüümide (proteaaside) järjestatud toimega. Proteaase võib tinglikult liigendada kahte rühma: 1) endopeptidaasid, mis hüdrolüüsivad ahelasiseseid peptiidsideid (pepsiin, gastriksiin, renniin, trüpsiin, kumotrüpsiin, elastaas, kollagenaas), ja 2) eksopeptidaasid, mis hüdrolüüsivad ahela otsmisi sideid (amino- ja karboksüpeptidaas, di- ja tripeptidaasid). Peaaegu kõik proteaasid sünteesitakse seedenäärmete sekretoorsetes rakkudes zümogeenidena (proensüümidenä), mis aktiveeruvad alles seedetrakti valendikus osalise proteolüüsi käigus (vt. ensümolooia kursus - piiratud proteolüüs ja autokatalüütiline aktivatsioon). Selline mehhanism väldib proteaase sünteesivate näärmerakkude autolüüsi. Proteaaside aktivatsiooni (aga ka sünteesi) kontrollivad mitmed valgulised inhibiitorid.

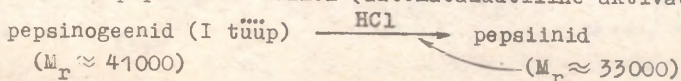
a) Seedimine suuõõnes. Vastavate E-de puudumise tõttu siin valkude seedimist ei toimu.

b) Seedimine maos. Valkude seedimine algab maos, kuna siin on olemas selleks vajalikud faktorid.

1. HCl. Moodustub mao limaskestast parietaalrakkudes. Protsessis toimub H^+ aktiivne transport 10^6 -kordse gradiendi vastu, kasutatakse ATP energiat ja osaleb K(H)-ATPaas. HCl täidab järgmisi funktsioone: a) denatureerib toiduvalke, mis kergendab proteaaside toimet; b) loob happelise keskkonna ($pH = 1,5-2,5$) pepsiini optimaalseks toimeks, c) aktiveerib pepsinogeene, d) reguleerib happe-leelistasakaalu, e) omab bakteritsiidset toimet.

2. Maomahla proteaasid. Toodetakse maonäärmete pearakkudes:

a) pepsiinid. Moodustuvad I tüüpi pepsinogeenidest HCl ja aktiivsete pepsiinide toimel (autokatalüütiline aktivatsioon)

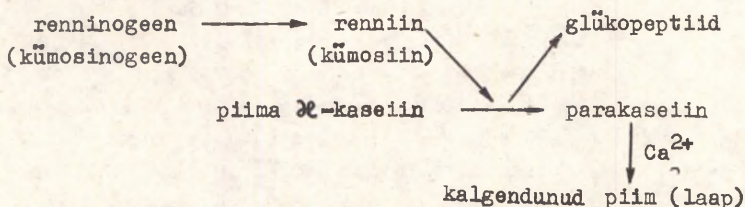


Pepsiinide toime pole kõrgelt spetsiifiline. Peamiselt hüdrolüüsivad nad peptiidsidemeid, mille moodustumises osalevad aromaatsete aminohapete (Phe, Tyr, Trp) karboksüülrühmad. Märksa aeglasemalt hüdrolüüsivad nad peptiidsidemeid, milleks karboksüülrühma annavad Leu, Asp ja Glu. Pepsiinide toime tulemusena tekib oligopeptiidide segu (albumoosid, peptoonid) ja vähesel määral vabu ΔH -id.

b) gastriksiin. Tekib II tüüpi pepsinogeenidest. Tema teke- ning toimemehhanism on analoogiline pepsiinide omaga.

Erinevalt pepsiinidest on gastriksiini pH optimum 3,0-5,0.

c) renniin. Esineb noorloomade ja rinnalaste maos. Tekib inaktiivsest pepsinogeenide homoloogist ning kalgendab piimavalgu järgneva skeemi kohaselt:

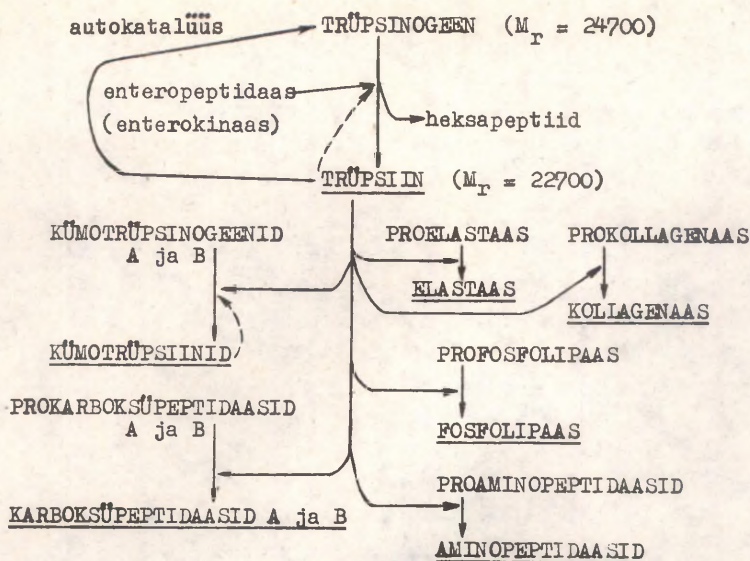


3. Lima. Eritatakse pindepiteeli ning näärme kaelarakkude poolt. Mutsiinide sisalduse tõttu täidab ta mao limaskesta kaitsefunktsiooni.

4. Regulaatorsed faktorid. Maomahla ja tema koostisse kuuluva HCl sekretsiooni tähtsaimad regulaatorid on gastriinid ja histamiin, mis moodustuvad mao limaskesta spetsialiseeritud rakkudes.

5. Spetsiifilised ained. Sii kuulub mukoproteiinine Castle sisemine faktor, mis kindlustab vitamiin B₁₂ omastamise.

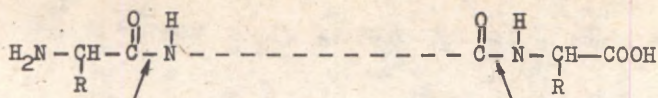
c) Seedimine peensooles. Valkude põhiline seedimine, mille käigus hüdrolüüsitakse veel seedimata valgud ning varem tekkinud polü- ja oligopeptiidid, toimub peensooles. Selles protsessis osalevad järgmised faktorid: 1. Pankrease bikarbonaadid. Neutraliseerivad happelise maosisaldise, kusjuures tekkiv CO₂ soodustab toidumassi läbisegamist. 2) Pankrease nõre proteaasid (trüpsiinid, kumotrüpsiinid, karboksüpeptidaasid, elastaas, kollagenaas) ja soole nõre proteaasid (aminopeptidaasid, di- ja tripeptidaasid). Nende E-de zümogeensed vormid aktiveeruvad soole valendikus ühtses aktiveerumissüsteemis, milles keskset rolli mängib trüpsiin (joon. 17).



Joon. 17. Zümogeenide aktivatsiooni skeem peensoole valendikus

Proteasaaside toime spetsiifilisus sooles on järgmine:

- trüpsiin hüdrolüüsib põhiliselt neid peptiidsidemeid, mille moodustumises osalevad aluselistel AH (Lys, Arg) COOH-rühmad, b) kümotrüpsiinid ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \pi$ jt.) omavad laiemat toimespetsiifilisust kui trüpsiin; eeskätt hüdrolüüsivad nad peptiidsidemeid, mille annavad Phe, Tyr, Trp. (NB! Trüpsiini ja kümotrüpsiinide koostoime asendab pepsiini efekti), c) elastaas omab laia toimespektrit, hüdrolüüsides põhiliselt peptiidsidemeid, milles osalevad Ala, Val, Ser, Leu, Gly jt. COOH-rühmad (NB! Kuigi trüpsiini ja kümotrüpsiini struktuuri ja elastaasi struktuuri vahel on analoogia, pole kaks esimest E võimelised hüdrolüüsima elastiini), d) kollagenaas hüdrolüüsib kollageeni, lõhustades põhiliselt sidemeid, milles osalevad Gly ja Pro COOH-rühmad, e) karboksüpeptidaasid ja ami-nopeptidaasid eraldavad peptiidahelast vastavalt C-terminaal-seid ja N-terminaalseid AH-eid (vt. skeem)



Aminopeptidaasid

(näit. alaniini aminopeptidaas,

leutsiini aminopeptidaas)

Karboksüpeptidaasid A* ja

B**

f) tri- ja dipeptidaasid hüdrolüüsivad vastavalt tri- ja dipeptiide valkude seedimise lõppetappidel (näit. soole nõre glütsiin-glütsiindipeptidaas hüdrolüüsib dipeptiidi Gly-Gly; prolinaas hüdrolüüsib peptiidsidemeid, milles osaleb Pro COOH-rühm, prolidaas hüdrolüüsib dipeptiide, milles proliini N-aatom on seotud happe amiidsidemega).

Kui pankrease nõre E-d osalevad põhiliselt õõnesiseses proteolüüsis, siis soole nõre E-d osalevad ka membraanses proteolüüsis (vt. eespool). Proteolüüsi lõppetapid võivad toimuda ka enterotsüütides, kus leiduvad aminopeptidaasid ja dipeptidaasid, mis teostavad rakusisest proteolüüsi.

3. Mitmesugused hormoonid: a) sekretiin (sünteesitakse peensoole ülaosas väikestes granulaarsetes S-rakkudes. Sekretiin reguleerib pankrease bikarbonaatide-rikka, kuid E-de-vaese nõre sekretsiooni), b) koletsüstokiniin-pankreozümiin (CCK-PZ) (sünteesitakse peensoole ülaosa endokriinsetes rakkudes ning ta reguleerib pankrease bikarbonaatidevaese, kuid E-de rikka nõre sekretsiooni), c) terve rida peptiidseid hormone (näit. GIP, VIP, enteroglükagoon, motiliin), mida toodetakse peensoole rakkudes.

Liitvalkude seedimine. Toidu nukleoproteiinide põhiosa lõhutakse maos HCl ja pepsiini toimel valguks ja nukleiinhapeteks. Ülejäänud osa lõhustub valguks ja NH-ks 12-sõrmiksooles (peamiselt trüpsiini toimel). Vabanenud NH-d (aga ka toidu NH-d) hüdrolüüsitakse peensoole ülaosas järmiste E-de järjestatud koostoides: a) nukleasid (pankrease nõre ja soole nõre ribonukleas ja desoksüribonukleas), mille toime NH-tele viib peamiselt lühikeste oligonukleotiidide ja ka vahesel määral mononukleotiidide moodustumisele, b) fosfodiesteraasid, mis lõhustavad peamiselt oligonukleotiide 3'- või

* eraldab põhiliselt aromaatsaid AH (Phe, Tyr, Trp)

** eraldab põhiliselt aluselisi AH (Lys, Arg)

5'-mononukleotiidideks, c) 3'- ja 5'-nukleotidaasid (fosfa-taasid), mis hüdrolyüsivad vastavaid mononukleotide nukleo-siidiks ja fosforhappe jäägiks, d) nukleosidaasid, mis lõ-hustavad vastavaid nukleosiide N-alusteks ja vabaks pentoo-siks. Tõenäoliselt realiseerub nukleosidaaside toime imendu-mise käigus (või isegi peale imendumist). Toidu kromoprotei-i-nid (Hb, müoglobiin)* lõhustatakse hüdrolyütiliste E-de toi-mel valguks ja pigmentiks. Kuna heem oksüdeerub seedumatuks hematiiniks**, siis ta väljutatakse, s.t. ta pole kasutatav organismi-spetsiifiliste kromoproteiinide sünteesiks.

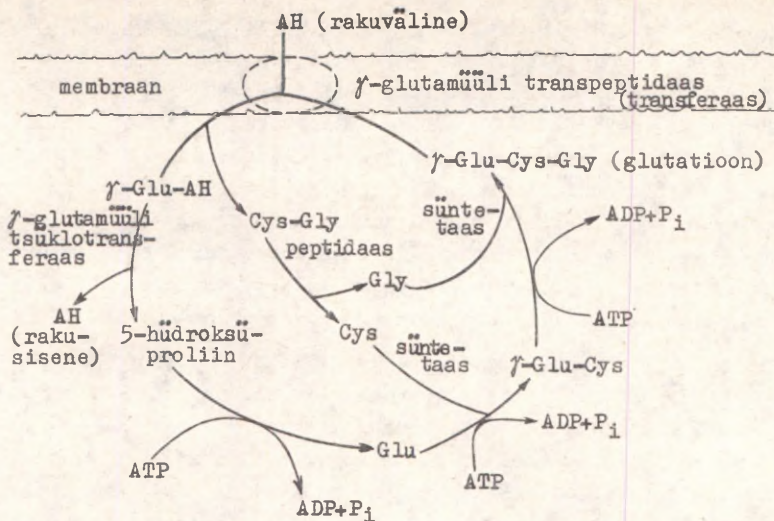
6. Valkude seedimisproduktide imendumine. AH transmembraanne transport. Põhilised imendumisele alluvad ühendid on va-bad AH (hüdrolyüsumata valkudena imenduvad mõned rinnapiima immunoglobuliinid; mõned albumiinid; botulismi, koolera, dif-teeria toksiinid). AH imendumine on üldiselt aktiivne prot-sess, mis nõuab energiat. AH imendumise peamised mehhanismid oleksid järgmised: a) Na⁺-gradiendist sõltuv imendumine (vt. SV imendumine), b) imendumine spetsiifiliste transportüs-teemide*** (valguliste kandjate) abil. Eksperimentaalselt on näidatud, et eksisteerivad erinevad valgulised kandjad struk-tuuriselt lähedastele AH-te rühmadele: a) neutraalsed, väike-se R-grupiga AH (Gly, Ala, Ser, Cys), b) neutraalsed, mahu-ka R-grupiga AH (Val, Leu, Ile, Phe), c) aluselised AH (Lys, Arg), d) happelised AH (Glu, Asp), e) Pro valguline kandja. AH konkureerivad üksteisega valgulise kandja pärast (näit. Leu pär-sib Ile ja Val imendumist). c) AH imendumine gluta-müüli tsükli**** vahendusel (vt. skeem). γ -glutamüültrans-feraas kui võtmeensüüm kannab glutatiooni glutamüülgru-pi läbi membraani transporditavale AH-le. Järgneb transpor-dikompleksi lõhustumine vabaks AH-ks ja 5-Hyp-ks. Tsükli ülejäänud reaktsioonides taastub glutatioon. Ühe AH ülekan-ne nõuab 3 ATP molekuli lõhustumist. d) väga väike osa AH imendub difusiooni teel.

* nad on toidus denatureeritud kujul

** seedumata on ka taimne klorofüll

*** vt. transpordi liikide loeng

**** tsükkel on oluline ka AH transpordil läbi membraanide ajukoe, lihaskoe, neerukoe jt. puhul



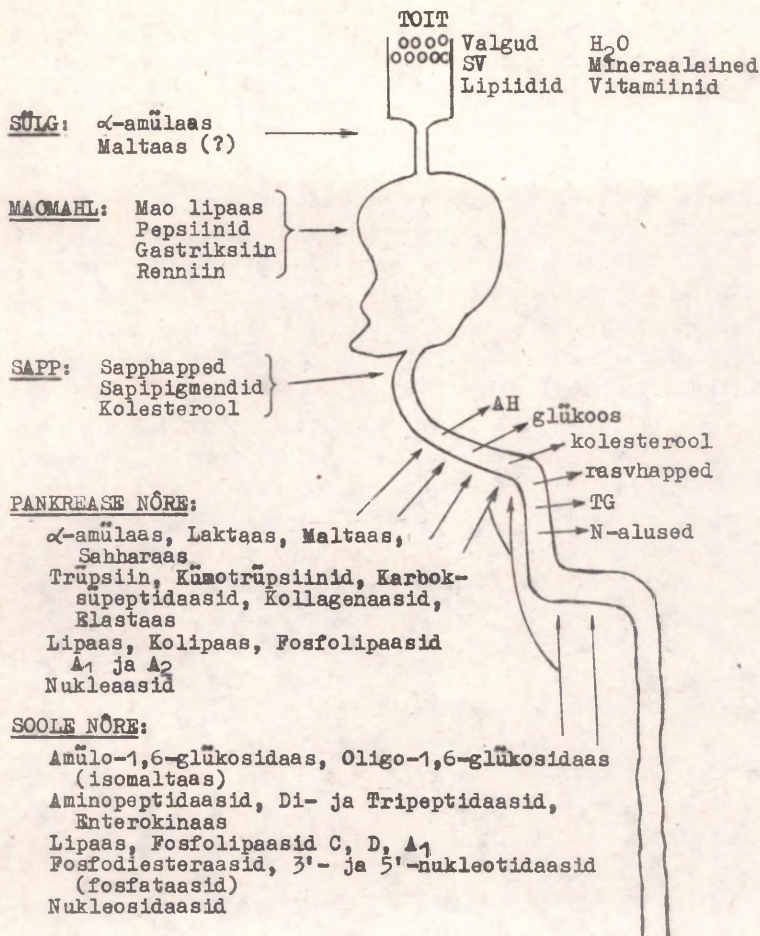
Esitaksime lõpuks ka seedimise üldskeemi (vt. lk. 105).

Teadmiste kontroll

1. Omandage DB kõige üldisemad põhimõisted.
2. Iseloomustage üldise ainevahetuse uurimise meetodeid.
3. Kuidas võib liigendada inimtoidu komponente?
4. Omandage SV, lipiidide ja valkude seedimise ensüümid. Kus toimub nende toitainete põhiline seedimine?
5. Milline ühine mehhanism töötab SV ja AH imendumisel?
6. Mis on mitsellid ja külomikronid?
7. Mis on seedeensüümide autokatalüütiline aktivatsioon (tooge näiteid)?
8. Kirjeldage glutamüüli tsükli tööd.

Kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, lk-d 318-326, 381-391, 441-460.
2. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, lk. 172-190.



Joon. 18. Seedimise üldskeem

Teoreetilis-laboratoorne praktikum nr. 10

Teema: BIOKEEMILISTE REAKTSIOONIDE ENERGEETILISED ASPEKTIID. BIOLOOGILISE OKSÜDATSIOONI ENSÜÜMID

Teadmiste algatase:

1. Ekso- ja endotermilised reaktsioonid.

2. Mikro- ja makroergilised ühendid.
3. Organismide liigendamine toitumise ja energiaallikate alusel.
4. Aeroobsed ja anaeroobsed organismid.

Üldised arusaamad. Kuigi kogu eluslooduse jaoks on primaarseks energiaallikaks päikese energia, on organismide elutegevuse aluseks orgaaniliste ühendite muundamine. Seejuures ei saa elav rakk kasutada kogu antud ühendi energiat*, kuna ainult teatud osa sellest on kehatemperatuuril muudetav tööks (soojus ei tule organismis töötegijana arvesse). Seda osa ühendi energiast nimetatakse biokeemia-alases kirjanduses vabaks energiaks (tähistatakse G).

Paljude biokeemiliste reaktsioonide võimalikkuse, töövoime ja suuna hindamiseks ei piisa soojusefekti (eksotermiline ja endotermiline) hindamisest, seetõttu kasutatakse järgmisi mõisteid: 1) eksergooniline reaktsioon - vaba energia vähenemisega (äraandmisega) kulgev reaktsioon, s.t. vaba energia muut on negatiivne ($-\Delta G$). Selline reaktsioon kulgeb peale käivitumist spontaanselt (näit. reaktsioon $A \rightarrow B$, kui ühendi A vaba energia $>$ kui ühendil B), 2) endergooniline reaktsioon - vaba energia suurenemisega kulgev reaktsioon, s.t. vaba energia muut on positiivne ($+\Delta G$). Reaktsiooni kulgemiseks on süsteemi vaja energiat juurde anda (näit. reaktsioon $A \rightarrow B$, kui ühendi A vaba energia $<$ kui ühendil B).

Kui reaktsioon $\Delta G = 0$, siis reaktsioon on tasakaaluseisundis, s.t. ta püüab kulgeda mõlemas suunas ühesuguse jõuga ja ta ei tee tööd.

Vaba energia arvutamise aluseks on standardne vaba energia (G^0)**. See on vaba energia, kui reageerivate ainete kontsentratsioon lahuses on 1 mool/l ning temperatuur = 25° ja pH = 0 (neis tingimustes $\Delta G = \Delta G^0$). ΔG^0 kui konstant lubab vastava reaktsiooni isotermi abil*** leida ΔG väärtuse reageerivate ainete mistahes kontsentratsiooni juures (s.t. hin-

* see on energiahulk, mis vabaneb soojuse kujul antud ühendi põletamisel kalorimeetris konstantsel rõhul

** arvestab ka seda, et G sõltub ka reageerivate ainete kontsentratsioonist

*** $\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[Produktid]}{[Lähteained]}$

nata reaktsiooni võimalikkust, töövõimet antud tingimustes). Bioloogilistes süsteemides määratakse G^0 pH 7 juures, seetõttu standardse vaba energia muut ΔG^0 -ga.

Kuna soojus ei tule töötajana elavas objektis arvesse (rakud ei suuda luua vajalikke temperatuurigradiente), siis tuleb orgaanilistes ühendites leiduv energia nende ühendite katabolismi käigus salvestada (enamasti salvestatakse see keemilise energia kujul), et vältida tema täielikku hajumist kasutl kujul - soojusena. SV, lipiidid, valgud ja nende hüdroolüüsiproduktid ei saa olla vahetult "kütuseks" rakuprotsessidele. Kõigepealt peab toimuma nende ühendite katabolism, mille käigus salvestatud energia antakse üle energiat vajavatele protsessidele. Järelikult on katabolism ja anabolism omavahel energeetiliselt seostatud (katabolismi ja anabolismi energeetilisest seostumise vormidest vt. vastav loeng). Katabolismi ja anabolismi energeetilises seostatuses mängib tsentraalset rolli makroergiline ühend - ATP.

Makroergilised sidemed. Orgaanilistes ühendites oleva vaba energia põhilisteks materiaalseteks kandjateks on aatomite vahelised sidemed. Seetõttu muutub ka alati antud ühendi vaba energia tase keemiliste sidemete muundumise käigus. Makroergilisteks (energiarikasteks sidemeteks*, tähistatakse ~) nimetatakse sidemeid, mille hüdroolüüsil toimuv vaba energia muut ($-\Delta G^0$) ületab 21 kJ/mol (ehk 5 kcal/mol). Näit. ATP hüdroolüüsireaktsioonil ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$) toimub vaba energia muut ($-\Delta G$) 30,6 kJ/mol** (7,3 kcal/mol).

Makroergilised sidemed on peamiselt esindatud fosfoanhüdriidsete, anhüdriidsete ja mitmesuguste estersidemete (eeskätt tioestersidemete) kujul. Seetõttu sisaldavad nad enamikul juhul makroergilise sideme lokaliseerimise kohal molekulis fosfori või väävli aatomit. Järgnevas tabelis on toodud inimorganismi metabolismis olulisemad makroergilised ühendid, aga ka mõned olulised mittemakroergilised fosfaadid.

* mõiste "energiarikas side", mida kasutatakse biokeemias, erineb mõistest "sideme energia". Viimase all mõistetakse füüsikalises keemias energiat, mis on vajalik kahe aatomi vahelise sideme lõhkumiseks molekulis

** järgmistel tingimustel: pH = 7,0, temperatuur = 37°C, Mg^{2+} liig, 1 M-ne lähteaine ja produktide kontsentratsioon

Tabel 5

Mõningate ühendite termodünaamiline skaala hüdro-
lüüsi $\Delta G^{0'}$ alusel* (pH = 7,0, temperatuuril
37°C, $[Mg^{2+}] = 0,001 M$)

Ühend	$\Delta G^{0'}$ kJ/mool	kcal/mool
Fosfoenoolpüruvaat (PEP)	-60,4	-14,4
cAMP	-49,9	-11,9
cGMP	-49,9	-11,9
1,3-difosfoglutseraat	-49,5	-11,8
Atseetoatsetüül CoA	-43,9	-10,5
S-adenosüülmetsiooniin (SAM)	-41,9	-10,0
Kreatiinfosfaat	-37,8	-9,0
ATP (\rightarrow AMP + PPi)	-37,4	-8,9
Aminohapete estrid kui valgu sünteesi vahetproduktid	-32,8	-8,1
$CH_3-C \begin{smallmatrix} \nearrow O \\ \searrow SCoA \end{smallmatrix}$	-32,3	-7,7
Palmitüülkarnitiin	-32,3	-7,7
UDP-glükoos	-31,8	-7,6
ATP ($+ H_2O \rightarrow$ ADP + Pi)	-30,6	-7,3
ADP ($+ H_2O \rightarrow$ AMP + Pi)	-28,9	-6,9
Glükoos-1-P	-21,0	-5,0
Galaktoos-1-P	-21,0	-5,0
Fruktoos-1-P	-15,9	-3,8
AMP (\rightarrow Adenosiin + Pi)	-14,7	-3,5
Glükoos-6-P	-9,2	-2,2
Glütserool-1-P	-9,2	-2,2

Märkus: Kuigi räägitakse makroergilistest sidemetest, oleks täpsem rääkida vaba energia muudust hüdrolüüsil, kuna energia muut ei tulene mitte ainult sideme hüdrolüüsist, vaid ka ühendi struktuurist (näit. cAMP, cGMP).

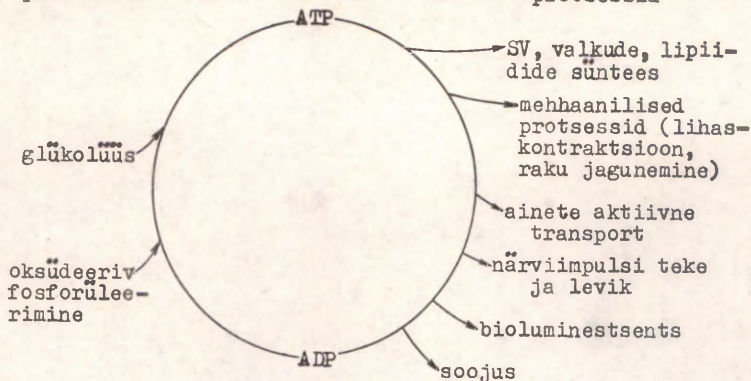
Tsentraalseks makroergiliseks ühendiks on ATP, mis seob eksergoonilisi protsesse endergooniliste protsessidega (vt. skeem). Seejuures, kui eksergoonilistes protsessides (katabolismis) leiab aset vaba energia muut üle 50,4 kJ/mool** (12 kcal/

* bioloogilistes süsteemides on $\Delta G^{0'}$ ulatus -8,4 kuni -60,4 kJ/mool

** reaktsiooni $ADP + P_i \rightarrow ATP$ $\Delta G^{0'}$ omab füsioloogilistes tingimustes antud väärtust (pH 0 juures ja 25°C puhul $\Delta G^{0'} = +35,3$ kJ/mool (+8,4 kcal/mool))

Eksergoonilised
protsessid

Endergoonilised
protsessid



mool), on võimalik energia salvestamine ATP molékulis.
Redokspotentsiaal ja elektronide ülekanne. Molekulid (aatomid) on erineva sugulusega elektronide suhtes. Kuna elektronide ülekandel töötab ühendite paar (üks loovutab e^- , teine võtab vastu), siis selleks, et näidata, milline ühend antud redoksreaktsioonis on e^- doonor (redutseerija) ja milline e^- aktseptor (oksüdeerija), kasutatakse redokspotentsiaali (E) väärtust (mõõdetakse voltides). Erinevate ühendite paaride (redutseeritud vorm/oksüdeeritud vorm) süstematiseerimise aluseks on kokkuleppeliselt võetud reaktsiooni $H_2 \rightleftharpoons 2 H^+ + 2 e^-$ redokspotentsiaal (E_0) pH = 0 ja 25°C juures, mis loetakse võrdseks nulliga. Füsioloogilise pH juures (pH = 7,0) on see aga võrdne -0,42 voldiga ($E_0' = -0,42 V$). Tabelist 6 näeme, et bioloogilised redokssüsteemid (redokspaarid) on järjestatavad E_0' väärtuse alusel. Järelikult redokssüsteemide redokspotentsiaal näitab, milliselt süsteemilt millisele süsteemile võidakse elektrone üle kanda, s.t. kuidas võivad kujuneda elektronide transpordiahelad (näit. süsteemilt H_2-2H^+ elektronid liiguvad kindlasti süsteemile $H_2O-1/2 O_2^*$, kuna molekulaarne õhuhapnik omab kõrget sugulust elektronidele ($E_0' = +0,82 V$)).

* H_2O omab väga madalat elektronide loovutamise võimet

Tabel 6

Mõningate redokssüsteemide E_0' väärtused
(kaheelektronilise ülekande puhul)

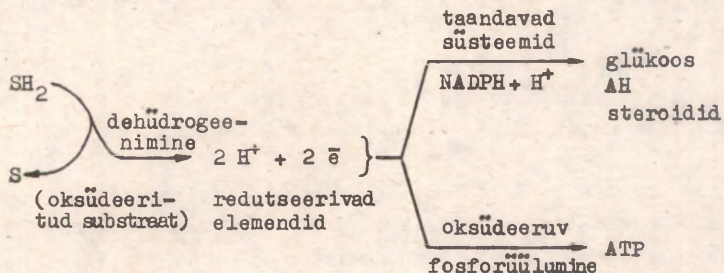
Red-vorm	Oks-vorm	E_0', V
α -ketoglutarat (α -KG)	suktsinaat (+ CO_2)	-0,67
atseetaldehüüd	atsetaat	-0,60
H_2	$\rightleftharpoons 2 H^+$	-0,42
isotsitraat	α -KG	-0,38
$NADH + H^+$	NAD^+	-0,324
$NADPH + H^+$	$NADP^+$	-0,320
β -hüdroksübutüraat	atseetoatsetaat	-0,28
laktaat	püruvaat	-0,19
malaat	oksaalatsetaat	-0,16
$NADH$ -dehüdrogenaas (redutseeritud)	$NADH$ -dehüdrogenaas (oksüdeeritud)	-0,114
etanool	atseetaldehüüd	-0,090
2 tsütokroom b (Fe^{2+})	2 tsütokroom b (Fe^{3+})	-0,040
suktsinaat	fumaraat	0,000
2 tsütokroom c (Fe^{2+})	2 tsütokroom c (Fe^{3+})	+0,230
2 tsütokroom a (Fe^{2+})	2 tsütokroom a (Fe^{3+})	+0,290
H_2O	$1/2 O_2$	+0,82
<hr/>		
H_2O	$OH + H^+$	+1,35

Dehüdrogeenimine. Bioloogilised objektid (v.a. fotosünteesivad rakud, organismid) saavad vajaliku energia ainult orgaaniliste ühendite oksüdeerimisest. Seejuures võib eristada järgmisi oksüdeerimise variante: 1) substraati oksüdeeritakse hapniku otsese liitmise teel oksüdaaside* abil (tekivad dihüdroksüderivaadid) või hüdroksülaaside** abil (tekivad monohüdroksüderivaadid), 2) S loovutab elektrone, s.t. oksüdeerub, 3) substraadilt võetakse vesinikuaatomeid, s.t. S oksüdeerub dehüdrogeenimise teel: $SH_2 + X \rightarrow S + XH_2$. Bioloogiliste oksüdeerumiste põhivariant (hõlmab sisuliselt ka teise variandi) loomorganismis ongi dehüdrogeenimine. Dehüdrogeenimiste kaudu toimuvate oksüdeerimisprotsesside rohkusele vaatamata on neil kõigil ühtne sisu: nende kaudu luuak-

* loomorganismi puhul kuulub tinglikult siia tsütokroom-oksüdaas

** vt. vastav loeng

se rakule vajalik energia 1) kas otsesel teel, s.t. varustades redutseerivate elementidega (H^+ , \bar{e}) taandavaid sünteesi, 2) või kaudsel teel, s.t. teostades S võetud redutseerivate elementide ülekannet molekulaarsele hapnikule ning sünteesides sellel ülekandel toimuva vaba energia muutuste arvel (vt. oksüdeeriv fosforüülumine) ATP (vt. skeem).



Bioloogiline oksüdatsioon. Bioloogilise oksüdatsiooni all mõistetakse orgaaniliste ühendite oksüdeerumist organismis vastavate ensüümide toimel. Bioloogilise oksüdatsiooni käigus toimub oksüdeeritavalt substraadilt võetavate redutseerivate elementide (H^+ , \bar{e}) ülekanne (reeglina on see paljuastmeline) lõppaktseptorile. Osa ülekandega kaasnevast vaba energia muudust läheb ATP sünteesiks (ülejäanud energia hajub soojuseks), s.t. bioloogilise oksüdatsiooni funktsiooniks on energia salvestamine rakule kättesaadavas vormis. Bioloogilise oksüdatsiooni osavõtul realiseerub SV, lipiidide ja ΔH katabolism lõppproduktideks*.

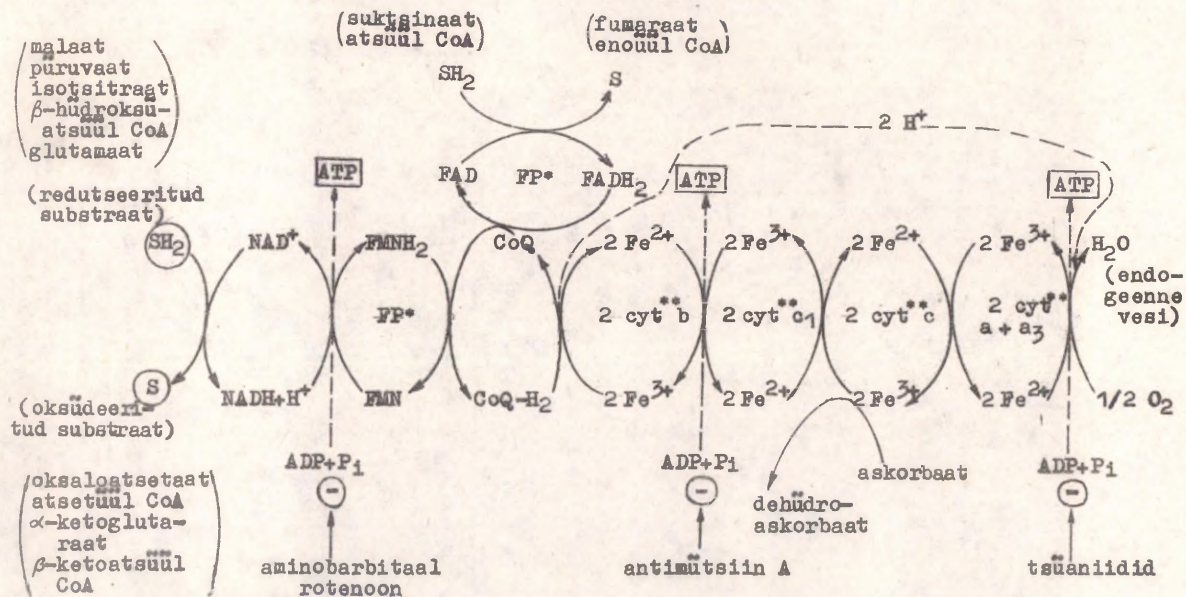
Oksüdeerimisreaktsioone võib jagada kahte põhigruppi:

a) aeroobne oksüdeerimine - redutseerivate elementide (võetakse oksüdeeritavalt substraadilt aeroobsete dehüdrogenaaside abil) lõppaktseptoriks on hapnik, b) anaeroobne oksüdeerimine - redutseerivate elementide aktseptoriks pole hapnik ja protsessi katalüüsivad anaeroobsed dehüdrogenaasid.

Hingamise biokeemiline sisu seisneb elava organismi varustamises energiaga, kuna koe hingamisel toimub orgaaniliste ühendite oksüdeerimine õhuhapniku manulusel, kusjuures orgaaniliste ühendite lõhustumisega kaasneb oluline vaba

* SV ja lipiidide puhul on need CO_2 ja H_2O , ΔH -te puhul aga CO_2 , H_2O ja karbamiid

Hingamisahela üldine skeem



* FP = flavoproteiin
 ** cyt = tsütokroom

datsiooni abiensüümide - katalaaside ja peroksüdaaside poolt. (Selline hingamisahel ei tööta mitokondrites ning ülekande energia ei salvestu, vaid eraldub kasutult - soojusena).

Oksüdeeriv fosforüülumine. S-di oksüdeerimine täielikus hingamisahelas on seostunud ATP sünteesiga. Seda mitokondrites toimuvat ATP sünteesi ADP-st ja P_i -st elektronide ülekandel (s.o. oksüdeerimine) toimuva vaba energia muudu arvel* nimetatakse oksüdeerivaks fosforüülumiseks. Redutseerivate elementide ülekanne hingamisahelas tingib vaba energia astmelise muudu. Kolmes hingamisahela lõigus (vt. skeem) on see muut piisav (ΔG langeb vähemalt 35,3 kJ/mool e. 8,4 kcal/mool või ΔE_0 kasvab 0,20-0,25 V) ATP sünteesiks. Neid kohti nim. hingamisahela seostumiskohtadeks oksüdeeriva fosforüülimisega (fosforüülimislookused).

Oksüdeeriva fosforüülimise intensiivsust hinnatakse kvantitatiivselt fosforüülimise koefitsiendiga P/O (näitab ADP-le kantud P_i molekulide arvu ühe tarbitud hapnikuaatomi kohta). Täieliku hingamisahela jaoks P/O = 3** ning tema harru jaoks - 2*** (vt. skeem). Hingamisahela kui protsessi üld-efektiivsus on ~48% (energia kogumuudust 221 kJ/mool salvestub 106 kJ****, ülejäänud eraldub soojusena).

Oksüdeeriva fosforüülimise mehhanismide selgitamiseks sobib parimini P.Mitchell'i kemoosmootne teooria, mille järgi ATP sünteesitakse ATP-süntetaasi abil (asub mitokondrite sisemembraanis), kusjuures reaktiivseks jõuks sellele protsessile on hingamisahelas toimuva elektronide transpordi poolt genereeritud prootoni gradient membraanivahelisest ruumist mitokondrite maatriksisse (küsimust käsitletakse detailsemalt vastavas loengus).

Oksüdeerimise ja fosforüülumise protsesside lahutamisel eraldub elektronide energia soojusena ning ATP sünteesi ei toimu (seda nim. vabaks e. mittefosforüüluvaks oksüdeerimiseks). Mõningad ained (türoksiin, progesteron, kaltsium, mõningad kõrgemad rasvhapped, 2,4-dinitrofenool, klorotetra-

* elektronide ülekanne, näiteks süsteemilt $NAD^+/NADH + H^+$ süsteemile H_2O/O_2 , tingib redokspotentsiaali suure erinevuse tõttu olulise vaba energia muudu $\Delta G_0 = 221$ kJ/mool ehk -52,7 kcal/mool)

** s.t. sünteesitakse 3 molekuli ATP

*** s.t. sünteesitakse 2 molekuli ATP

**** 3 ATP = 3 x 35,3 = 106 kJ

tsükliin jt.) põhjustavadki sellise lahutamise. Need ained suurendavad mitokondrite sisemembraani läbitavust prootonitele, mistõttu ei kujune ATP sünteesiks vajalikku H^+ -gradienti.

Hingamise kontrolli osa (järelkult ka ATP sünteesi stimulaatori rolli) etendab [ADP]. ATP sünteesi tõusuga [ADP] mitokondrites väheneb ja ATP sünteesi stimulatsioon väheneb. Järgnevalt ATP kasutamisel rakuprotsessides moodustub P_i ja ADP, s.t. tekib ATP sünteesi võimas stimulaator - ADP (NB! tagasiside).

Peale hingamisahela leidub endoplasmaatilise retiikulumi membraanides (aga ka mitokondri välismembraanis) hüdroksüüliv süsteem, mille tsentraalseks autooksüdeerivaks lüliks on $cyt P_{450}$. Selle ahela (käsitletakse vastavas loengus) lõppproduktiks on oksüdeeritud S (hüdroksüülitud vormis), vesi ja energia (soojuse kujul). Märkigem, et oksüdeerimise ahelad, mis sisaldavad $cyt P_{450}$, mängivad olulist rolli enamiku ravimite hüdroksüülimises, aga ka mitmete endogeensete S hüdroksüülimises steroidhormoonide ja katehhoolamiinide biosünteesis. Need ahelad teostavad ka membraansete lipiidide koosseisu kuuluvate küllastumata rasvhapete peroksiidset oksüdeerimist.

Teadmiste kontroll

1. Kuidas iseloomustab vaba energia muut reaktsiooni kulgemist, töövoimet?
2. Milliseid ühendeid nim. makroergilisteks? Nimetage tähtsamaid makroergilisi ühendeid.
3. Mida näitab redokspaaride redokspotentsiaal?
4. Kuidas rakendub dehüdrogeenimisel eraldatud redutseerivate elementide energia?
5. Mis on bioloogiline oksüdatsioon, anaeroobne ja aeroobne oksüdeerimine? Mida nim. hingamisahelaks?
6. Omandage hingamisahela skeemid.
7. Mida tähendab oksüdeerimis- ja fosforüülmisprotsesside seostatus ja lahutatus?

Kasutatud kirjandus

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., Биологическая химия, 1983, lk. 280-298.
2. Василенко Ю.К., Биологическая химия, 1978, lk. 143-172,
3. Loengute konspekt.

Teoreetiline praktikum nr. 11

Teema: FOTOSÜNTEES

Teadmiste algtase:

1. Kromoproteiinide ja tsütokroomide ehitus ja funktsioonid.
2. Osüdeeriva fosforüülmise mõiste ja bioloogiline sisu.
3. Elektronide transpordiahelad.

Üldised arusaamad. Biosfäär kui tervik vajab pidevat* energia juurdevoolu biosfäärivälisest allikast. Eluprotsessideks vajaliku vaba energia taastamisel ja suurendamisel kaasaja biosfääris on fotosüntees ainus kvantitatiivselt arvestatav protsess. Kemolitotroofsete mikroorganismide roll orgaaniliste ühendite vaba energia genereerimisel on väike, kuna nad kasutavad selleks energiaallikaid**, millede kogused, võrrelduna päikeseenergiaga, on tühised. Lisaks sellele on nende energiaallikate regenereerimine osaliselt seotud fotosünteesil salvestatud energia kasutamisega. Fotosüntees on rohelistes taimedes ja fotosünteesivates bakterites kulgev protsess, mille käigus valgusenergia muudetakse orgaaniliste ühendite keemiliseks energiaks (fotosünteesi teel tekib üle 99%*** primaarselt sünteesitavast orgaanilisest ainest). Kõrgemad taimed, vetikad ja tsüanobakterid võtavad CO₂ redutseerimiseks vajalikud elemendid veest. Fotosünteesi kirjeldab järgmine võrrand: $\text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + h\nu \longrightarrow (\text{CH}_2\text{O})^{****} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$. Fotosünteesivate bakterite puhul on redutseerivate elementide allikaks anorgaanilised või orgaanilised ühendid ning fotosünteesi kirjeldab järgmine võrrand: $\text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{S} + h\nu \longrightarrow (\text{CH}_2\text{O})^{****} + \text{H}_2\text{O} + \text{S}$.

Süsivesikute biosüntees ongi valgusenergia põhiline kasutamise viis fotosünteesil. Valgusenergia leiab kasutamist aga ka AH-te, valkude ja lipiidide biosünteesis, ioongradientide loomisel, nitraatide redutseerimisel. Paljud foto-

* osa ühendite energiast jääb organismide poolt kasutamata ja hajub soojusena

** kasutavad CO₂ fikseerimiseks redutseeritud anorgaaniliste ühendite (H₂S, NH₃, Fe²⁺) oksüdatsiooni energiat

*** kehtib tänapäeva biosfääri kohta (aastas sünteesitakse 5.10¹⁰ tonni orgaanilist ainet, milleks fikseeritakse 2.10¹² tonni CO₂ ja eraldatakse 13.10¹⁰ tonni O₂)

**** (CH₂O) = süsivesik

sünteesivad bakterid ning tsüanobakterid tarbivad valgusenergiat ka N_2 fikseerimiseks. Lisagem, et fotosüntees on bio-sfääris ainus protsess, mille käigus moodustub molekulaarne hapnik.

Fotosünteesis kui kompleksses protsessis võib eristada: 1) valgusstaadiumi (selle staadiumi reaktsioonid, milles toimub valguskvantide neeldumine ja energia migratsioon ning ATP kui assimilaatorjõu (sünteesijõu) ning $NADPH + H^+$ kui redutseeriva jõu genereerimine, vajavad valgusenergiat), 2) pimedusstaadiumi (orgaanilise aine sünteesireaktsioonid CO_2 fikseerimise ja redutseerimise teel, mis ei vaja valgusenergia otsest osavõttu). Lähtudes aga reaktsioonimehhanismidest võib fotosünteesi jagada järgmisteks faasideks: 1) fotofüüsikaline faas (hõlmab valguse neeldumise pigmentsüsteemis ja energia migratsiooni reaktsioonitsentrisse), 2) fotokeemiline faas (hõlmab protsesse, mis on seotud ATP ja $NADPH + H^+$ genereerimisega) ja 3) biokeemiline faas (hõlmab protsesse, mis on seotud CO_2 fikseerimise kaudu orgaanilise aine sünteesiga varemloodud $NADPH + H^+$ ja ATP ärakasutamisega).

Fotosünteesi kvantsaagis ja kvanttarve. Valguskvandi (footoni) energia ja valguse lainepikkuse (võnkesageduse) vahel esineb pöördvõrdeline sõltuvus (lühemalainelise valguse kvandid on suhteliselt energiarikkamad kui pikemalainelise valguse kvandid):
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda},$$
 kus E on footoni energia (džaulides), h - Plancki konstant ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s), c - valguse kiirus ($3 \cdot 10^8$ m.s $^{-1}$), λ - valguse lainepikkus (m), ν - lainesagedus (hertsides). Fotosünteesis saab kasutada vaid neeldunud valgust, kusjuures neeldunud energiarikkad "sinised" ja energiavaesemad "punased" kvandid viivad ühesuguse energia kogusega fotokeemilise reaktsiooni produktide tekkele. Järelikult on fotosünteesi kiirus proportsionaalne neelatud kvantide (footonite) hulgaga*. Seetõttu on valgusenergia kasutamise efektiivsust otstarbekas väljendada fotokeemilise protsessi kvantsaagisena, mis kujutab endast assimileeritud CO_2 (eraldunud O_2) molekulide ja neeldunud kvantide suhet

* mitte aga nende energiasisaldusega, s.t. neelatud energia-ga

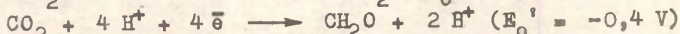
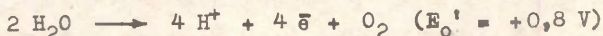
(kvantsaagis = $\frac{\text{assimileerunud CO}_2 \text{ molekulide arv}}{\text{neeldunud kvantide arv}}$).

Kvantsaagise pöördarvu nimetatakse kvanttarbeks.

Spektri nähtava osa footonite* energia on lainepikkusest sõltuvalt 1...3 eV. Sellise energiaga footonid suudavad ergastada pigmentide molekulide neid destruktureerimata (ultra-violettkiirte 6...10 eV energia põhjustab destruktureerimist, infrapunased energiavaesed footonid aga ei suuda viia 3 ergastatud olekusse).

Fotosünteesi energaetika, kasutegur ja regulatsioon.

CO₂-st ja H₂O-st süsivesiku moodustumise energaetilist efekti võib arvutada ka E₀' väärtustest, lähtudes kahest reaktsioonist:



Et 1 $\bar{\text{e}}$ ülekandeks CO₂-le tuleb ületada 1,2 V potentsiaalide vahe, siis nelja $\bar{\text{e}}$ puhul on energiakulu $E = 4 \bar{\text{e}} \cdot 1,2 \text{ V} = 4,8 \text{ eV}$ ehk 468,6 kJ.mool⁻¹. Ühe molekuli O₂ eraldamiseks ja CH₂O sünteesiks piisaks teoreetiliste arvutuste alusel 3-st punase valguse kvandist (λ 680 puhul võrdub üks einstein** 167,3 kJ). Et eksperimentaalselt leitud kvanttarve kõigub 4-12 kvandi vahel, siis loetakse, et 1 molekuli O₂ eraldamiseks peab neelduma vähemalt 8 kvanti, mis annaks fotosünteesi kasuteguriks 35%

$$\eta = \frac{468,6 \text{ kJ} \cdot 100}{167,3 \text{ kJ} \cdot 8} = 35\%.$$

Loomulikult peegeldub leitud kasutegur teoreetiliselt võimalikku kasutegurit. Reaalsetes tingimustes, kus kasutegurit mõjutavad temperatuur, valgustatus, veega varustatus, neeldatud kvandi lainepikkus ja fotosünteesiva koe füsioloogiline seisund, jäävad η väärtused 0 ja 35%*** vahele.

Fotosünteesi regulatsiooni puhul võib tõenäoliselt rääkida vaid teatud radade regulatsioonist pimedusstaadiumis, kuna fotosüntees tervikuna on teatud mõttes "reguleerimata"-kõigil taimedel on kasulik soodsates tingimustes maksimaal-

* footon (ehk elektromagneetilise kiirguse 1 kvant)

** punase valguse jaoks 680 nm juures 1 kvant = 1,76 eV
(1 mool selliseid footoneid s.o. 1 einstein = 167,3 kJ)

*** üldiselt kasutatakse arvu 20-28%

selt luua uut elumassi.

Taimelehele langenud valgusest läheb fotosünteesiks väike osa (0,1–0,5%). Osa lehele langenud valgusest läbib lehte, osa peegeldub tagasi, suurem osa muutub soojusenergiaks, mis on oluline transpiratsiooni tagamiseks.

Fotosünteesi intensiivsus ja selle määramine. Fotosünteesi intensiivsust e. kiirust võib kõrgemate taimede puhul mõõta neljal viisil: 1) CO_2 neeldumise, 2) O_2 eraldumise, 3) fotosünteesiva objekti massi suurenemise ja 4) assimilatsioonidesse talletatud energia koguse järgi. Fotosünteesi intensiivsus näitab seega ajaühikus neeldunud CO_2 (eraldunud O_2 , moodustunud assimilatsioonidesse talletatud energia) kogust fotosünteesiva objekti pinna- või massiühiku kohta (näit. $\text{mgCO}_2 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Sageli avaldatakse neeldunud CO_2 hulk klorofülliga kohta, näit. $\text{mgCO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ klorofüll} \cdot \text{min}^{-1}$.

Fotosünteesivate süsteemide organisatsioon. Fototroopsete eukarüootide fotosünteesivaks süsteemiks on rakuorganellid – kloroplastid, millede struktuurielementideks on: 1) kaksikmembraan, 2) strooma e. maatriks, 3) stroomas lokaliseeruv membraansüsteem.

Maatriks pole homogeenne vaid peengranulaarne mass, milles paiknevad kloroplastide DNA, RNA, 70S ribosoomid**, tärgliseterad ja plastograanulid (tärgliseteradesse koguneb fotosünteesil tekkiv tärgklis, plastograanulid on membraansete lipiidide reservuaariks). Strooma põhimassi moodustavad veeslahustuvad valgud, millede hulka kuuluvad ka CO_2 fikseerimist katalüüsivad E-d, aga ka fotosünteesis sekundaarselt moodustuvate ühendite (tärgklis, lipiidid) ja valkude sünteesil vajalikud E-d. NB! Maatriks on klorofüllivaba.

Kaksikmembraan koosneb välismembraanist (täidab sisuliselt kaitsefunktsiooni, teda ei läbi molekulid, mille $M_r > 10000$), membraanide vahelisest ruumist ja sisemembraanist. Viimane on suhteliselt läbimatu suurtele molekulidele, H^+ , OH^- , enamikule laengut kandvatele molekulidele, mõningaile väikestele neutraalsetele molekulidele (näit. sorbiit). Sisemembraanis on rida translokaase füsioloogiliselt oluliste ühendite

* heades valgustustingimustes võib 1 dm^2 lehepinda 1 tunnis assimileerida 40 kuni 80 mg CO_2

** kloroplastidel on rakutuumast sõltumatu geneetiline süsteem, seetõttu ka iseseisev pooldumisvõime

transpordiks: 1) ATP-ADP translokaas, mis transpordib ATP kloroplasti ja ADP sealt välja, 2) fosfaattranslokaas, mis kergendab Pi sisestumist ja 3-fosfoglutseriinaldehüüdi (või dihidroksüütsetoofosfaadi) väljumist, 3) dikarboksülaatt-translokaas, mis teostab dikarboksülaatide (oksaloatsetaat, malaat, suksinaat, fumaraat, aspartaat, glutamaat) antiporti. CO₂ difundeerub kloroplasti kiirusega, mis on fotosünteesiks piisav.

Maatriksis lokaliseeruv membraansüsteem on tihedas struktuur-funktsioonilises seoses kloroplastide sisemembraaniga. Antud membraansüsteem koosneb lamedatest kotikujulistest moodustistest e. tülakoididest*. Tülakoidide membraan on subühikulise struktuuriga ning sellés paiknevad lipiidid ning klorofüll pole valguga seostunud mitte elektrostaatiliste**, vaid apolaarsete sidemetega (fosfolipiidide rasvhappejäägid ja klorofüllü fütoolijääk on sukeldunud valgugloobulite hüdrofoobsesse sisemusse, moodustades lipoproteiinseid komplekse). Tülakoidide pinnal paiknevad korrapäraselt 4-st subühikust koosnevad globulaarsed moodustised (diameetriga 20 nm), mida nim. kvantosoomideks ja mis osalevad seostusfaktorina ATP sünteesil ADP-st ja Pi-st. Tülakoidide membraanides luuakse ka NADPH+H⁺. Mõõtmete, kuju ja ruumilise paigutuse poolest eristatakse kõrgemates taimedes kahte tüüpi tülakoidide: a) graanitülakoidid (kettakujulised tülakoidid, on 5-kuhi 30-kaupa paigutunud üksteise peale pakkidesse, mida nim. graanideks***), b) stroomatülakoidid (mulgustunud tülakoidid, mis moodustavad kanalite süsteemi). Graanitülakoidid ja stroomatülakoidid on omavahel seostunud, s.t. stroomatülakoidid ühendavad graane omavahel.

Stroomatülakoidides esineb ainult I fotosüsteem, graanitülakoidides aga I ja II fotosüsteem (vt. vastav loeng).

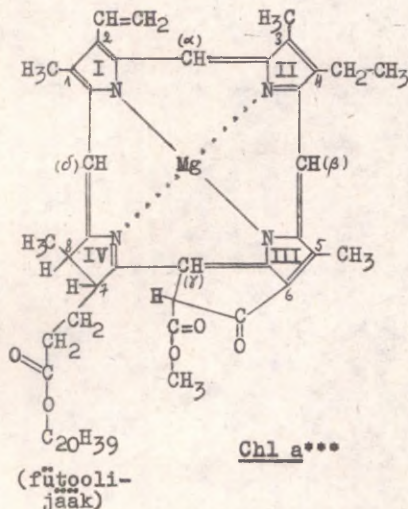
Prokarüootide fotosünteesivaks süsteemiks on membraansed moodustised - kromatofoorid****, milledesse on koondunud pigmendid ja ETA komponendid. Bakteritel eristatakse nelja tüüpi kromatofore: 1) rakumembraaniga seotud vesikulaarsed kromatofoorid, 2) pakkidesse koondunud kromatofoorid, 3) ra-

* tekivad sisemembraani sissesopistumise (pungumise) teel
** nagu klassikalise kaksikmembraani puhul
*** graanid esingvad vaid kõrgemate taimede kloroplastides
**** meenutavad tülakoide

kumembraani väljasopistisega ümbritsetud kromatofoorid, 4) lamellitaolised rakumembraani väljasopistised. CO_2 fikseerimise jm. ensüümsüsteemid paiknevad tsütoplasmas.

Fotosünteesi pigmendid. Vastavalt keemilisele ehitusele jagunevad need pigmendid kolme rühma: 1) klorofüllid, 2) karotinoidid, 3) fükobiliinid.

Klorofüllide (Chl) põhiesindajaks on klorofüll a (Chl a),



mis on protoporfüriini derivaat*, sisaldab Mg aatomit ja alkoholset hüdrofoobset fütoliijääki. On andmeid, et Chl a esineb kaheksas vormis ("punased" maksimumid 661, 675, 680, 686, 693, 700 ja 710 nm) ja klorofüll b (Chl b)** kaheksas vormis ("punased" maksimumid 640 ja 648 nm). Selline mitmekesisus raagib pigmentsüsteemi diferentseeritud ehitusest ning sellest, et süsteemi erinevad vormid täidavad fotosünteesis erisuguseid funktsioone.

Lähedaste neeldumismaksimumidega pigmentivormide esinemine on oluline eeskätt energia migratsioonil (vt. vastav loeng).

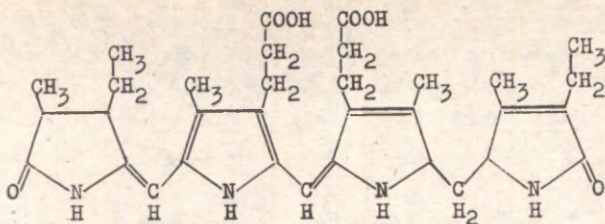
Karotinoidid on kollased pigmendid, mis koosnevad 5-st isopreenijäägist. Karotinoidid jaotatakse: a) karotiinideks (küllastumata, hapnikku mittesisaldavad süsivesinikud) ja b) ksantofüllideks (nende ehitusesse kuulub ka hapnik kas hüdroksüül- või epoksürühmas). Levinuimad karotinoidid on β -karotiin, luteiin, violaksantiin, krüptoksantiin ja zeaksantiin.

Fükobiliinid sisaldavad nagu klorofüllgi nelja pürrooltauma, mis pole aga seostunud porfüriinirõngaks, vaid paiknevad lineaarselt. Fükobiliinid seostuvad membraanides val-

* nagu heemgi

** erineb Chl a-st vaid selle poolest, et asendis 3 on $-\text{CH}_3$ asemel $-\text{CHO}$

*** moodustab ~70% kõrgemate taimede klorofüllist



fukooerütrobiliin (leitnud punavetikatest)

kudega,
andes kro-
moprotei-
ne (näit.
fukooerüt-
riin on
fukooerüt-
robiliini
kompleks

valguga, fükotsüaniin aga fükotsüanobiliini* kompleks val-
guga). Fükobiliinid asendavad vetikates II fotosüsteemis
kõrgematele taimedele iseloomulikku Chl b.

Klorofüllid ja nn. lisapigmendid. Klorofüllid (põhiliseks
on Chl a) neelavad valgust lainepikkusel 400–470 nm ja 620
kuni 710 nm. Tänu nn. lisapigmentidele kaetakse ka vahemik
470–620 nm (näit. β -karotiin neelab valgust vahemikus 470–
520 nm, fukooerütriin vahemikus 520–570 nm, fükotsüaniin va-
hemikus 570–630 nm jne.). Lisapigmente nim. ka aktseessorpig-
mentideks ja nad täidavad järgmisi funktsioone: 1) annavad
neelatud valgusenergia 80–100% ulatuses Chl a-le (tänu sel-
lele on fotosüntees võimalik ka neis spektriosades, milles
klorofüllid valgust ei neela), 2) kaitsevad** klorofüllid jt.
fotosünteesi (süsteemide) komponente liigse valguskiiruse
fotodestruktsiooni) eest.

Teadmiste kontroll

1. Mis on fotosüntees ja millisteks staadiumideks ta jaotub?
2. Millised protsessid on seotud fotosünteesi vastavate faa-
sidega?
3. Omandage kvantsaagise ja kvanttarbe mõisted.
4. Iseloomustage kloroplastide ehitust.
5. Omandage Chl a ja Chl b struktuur ja funktsioonid. Milli-
seid funktsioone täidavad nn. lisapigmendid?

Kirjandus

1. Строев Е.А., Биологическая химия, 1986, lk. 190–219.
2. V.Tohver "Üldine biokeemia", Tln, 1977, lk. 391–423.
3. Loengute konspekt.
4. H.Miidla "Taimefüsioloogia", 1984, lk. 117–165.

* iseloomulik tsüanobakteritele
** eriti karotinoidid, mis liigse energia kulutavad ülemi-
nekuks trans-vormist cis-vormi

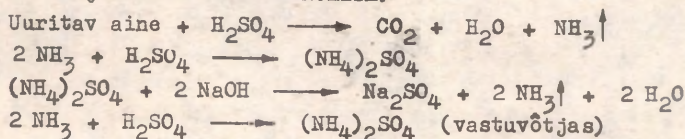
LABORATOORSED TÖÖD

Töö nr. 1. Valkude kvantitatiivne määramine toiduainetes ja loomsetes kudedes Kjeldahli järgi

Põhimõtte

Lämmastiku määramiseks uuritav orgaaniline aine mineraliseeritakse konts. H_2SO_4 -ga, millele on lisatud lõhustumist kiirendava ja keemistemperatuuri tõstva katalüsaatorina $CuSO_4$ ja K_2SO_4 segu. Mineraliseerimise käigus C oksüdeerub CO_2 -ks, H H_2O -ks ning uuritavas aines sisalduv N eraldub NH_3 -na, mis vaavelhappega annab ammooniumsulfaadi - $(NH_4)_2SO_4$. Viimase lõhustumisel leelise toimele Kjeldahli aparatis eraldub NH_3 , mis destilleeritakse veeauruga vastuvõtjasse, kus ta seotakse täpse kontsentratsiooniga vaavelhappe poolt. Vastuvõtjasse järelejaanud vaavelhappe (võetakse alati ülehulgas) kogus määratakse leelisega tiitrimisel.

Kjeldahli meetodi kemism:



$$N \text{ hulga leidmine } \%-des (x): x = \frac{(a-b) \cdot 0,00014 \cdot 100 \cdot 100}{c},$$

kus a - 0,01 N NaOH hulk kontrollkatse tiitrimiseks (ml);
 b - sama reagenti hulk (ml) proovi tiitrimiseks; c - uuritava aine hulk (g); 0,00014 - N hulk (g), mis vastab 1 ml-le NH_3 poolt neutraliseeritud 0,01 N H_2SO_4 -le.

Tööriistad

1.1. Põletamine. Kaaluge analüütilistel kaaludel (klaasplaadil) täpne hulk (200-300 mg vahel) uuritavat ainet ja viige see koos klaasplaadiga Kjeldahli kolbi. Järgnevalt lisage tõmbkapi all 3 ml konts. H_2SO_4 (olla ettevaatlik) ja spaatli abil ca 0,5-1 g segu ($CuSO_4 + K_2SO_4$). Segage kolvi sisu kolvi ettevaatliku keeramisega, seejärel sulgege kolb spetsiaalse korgiga ja kinnitage (NB! veidi kaldu) tõmbkapis elektrivõi gaasipliidile. Kuumatage kolvi sisu, kuni ta omandab rohekassinise värvuse (selleks kulub 2-5 tundi). Järgnevalt jahutage kolb, lisage (tõmbkapi all) ettevaatlikult 20-30 ml

destilleeritud vett ja kandke kolvi sisu kvantitatiivselt (loputades 2-3 korda) 100 ml-sse mõõtkolbi, mille maht viige destilleeritud veega margini. Analooiline põletamine viige paralleelselt läbi kontrollkatsega teises Kjeldahli kolvis, millesse uuritava aine asemele on võetud sama kogus destilleeritud vett.

1.2. Ammoniaagi destilleerimine Kjeldahli aparaadis

a) Aparaadi ettevalmistamine. Kjeldahli aparaat koosneb aurustist, kaitsetorust, destillatsioonikolvist, jahutist ja vastuvõtjast. Enne destillatsiooni aurutage aparaat läbi puhastamise ja NH_3 eemaldamise eesmärgil. Selleks valage aurustisse destilleeritud vett, mis on hapustatud mõne tilga H_2SO_4 -ga (viimane seob õhust vette läinud NH_3). Nüüd viige destillatsioonikolbi 2-3 ml destilleeritud vett ja keetke aurusti sisu 5 minutit. Gaasileegi eemaldamisel aurusti alt tõmmatakse (vaakumi tõttu) destillatsioonikolvi sisu kaitsetorusse ja aparaat ongi puhas.

b) Destilleerimine. Mõõtke vastuvõtjasse täpselt 10 ml 0,01 N H_2SO_4 ja lisage 5 tilka Taširo indikaatorit (metüülpunase ja metüleensinise segu). Vastuvõtja paigutage nii, et jahuti sisemise toru alumine ots ulatuks vastuvõtjas olevasse väävelhappesse. Järgnevalt viige (läbi lehtri), avades vastava pitsuti, destillatsioonikolbi 1 ml uuritavat vedelikku, loputage lehter 0,5 ml destilleeritud veega ja lisage destillatsioonikolbi (läbi lehtri) 2 ml 33%-st NaOH. Sulgege pitsut ja destilleerige 10-15 min jooksul, alates vedeliku keemisest destillatsioonikolvis. NH_3 eraldumise lõppemist saab kindlaks teha järgmiselt: märg punane lakmuspaber asetatuna jahuti sisemise toru alumise otsa juurde, ei muuda oma värvust.

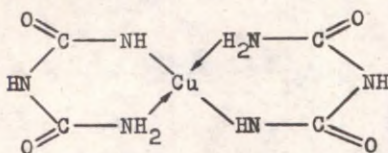
Peale destillatsiooni eemaldage vastuvõtja ja tiitrige temas ammoniaagiga mitteseotud H_2SO_4 0,01 N NaOH-lahusega kuni rohelise värvuseni (neutraalpunkt). Destilleerimine ja tiitrimine teostage analoogiliselt ka kontrollahusega.

1.3. N ja valgu hulga arvutamine. Järgnevalt arvutage N hulk uuritavas aines (vt. valem) ning, kasutades koefitsienti $\frac{100}{16} = 6,25$, leidke valgu hulk uuritavas aines. Koefitsient tuleneb asjaolust, et N sisaldus valkudes on keskmiselt 16%.

Töö nr. 2. Värvusreaktsioonid aminohapetele ja valkudele

Värvusreaktsioonid leiavad rakendamist ΔH -te ja valkude kvalitatatiivsel ja kvantitatiivsel määramisel (vt. eespool). Konkreetsetes töös võrreldakse munavalgu ja želatiini aminohappelist koostist. Seetõttu sooritage järgnevad katsed paralleelselt munavalgu- ja želatiinilahusega ja tulemused esitage võrdleva tabelina, märkides positiivse reaktsiooni plussmärgiga.

2.1. Biureedireaktsioon. Viige spaatliga kuiva katseklaasi ca 0,1 g karbamiidi ja kuumutage gaasileegil. Kuumutamine lõpetage, kui katseklaasi sisu peale esialgset sulamist tahkub, st. moodustub biureet ja NH_3 , mida on võimalik ära tunda lõhna järgi. Jahutage biureet, lisage 1 ml 10%-list NaOH , loksutage biureedi lahustumiseni ja lisage 1-2 tilka 1%-list CuSO_4 . Moodustub sinakasvioletne biureedi komplekssool vasesga.



biureedi komplekssool vasesga

NB! Hoiduge CuSO_4 ülehulgast, sest tekkiva sinise vaskhüdroksiidi liig maskeerib reaktsiooni.

Tehke analoogiliselt katse ka uuritavate lahustega: 1 ml lahusele lisage 1 ml 10%-list NaOH ning peale loksutamist - 1-2 tilka 1%-list CuSO_4 .

2.2. Ninhüdriniireaktsioon. Võtke katseklaasidesse 0,5 ml uuritavaid lahuseid, lisage 0,5 ml 0,5%-list ninhüdrini vesilahust ja keetke 1-2 min. NB! Tekkinud värvus muutub seisimisel siniseks.

2.3. Sakaguchi reaktsioon. Võtke katseklaasidesse 2 ml uuritavaid lahuseid, lisage 5-6 tilka α -naftooli alkoholset lahust ja 5-6 tilka 5%-list NaOBr . Segage ja lisage 5 tilka 40%-list karbamiidilahust värvuse stabiliseerimiseks.

2.4. Hopkins-Cole'i reaktsioon. Lisage 0,5 ml-le uuritavatele lahustele mõned tilgad glüoksüülhappelahust ja segage. Saadud segu kihitage (ettevaatlikult) teises katseklaasis olevale konts. H_2SO_4 -le. Tekib ringreaktsioon.

2.5. Ksantoproteiinireaktsioon. Võtke katseklaasidesse 5 tilka uuritavaid lahuseid, lisage 3 tilka konts. HNO_3 , keetke ettevaatlikult ja fikseerige tekkinud värvused. Peale katseklaaside jahtumist lisage neisse 10-15 tilka 20%-list NaOH kuni tekib dinitrotürosiini Na-soola tõestav värvus.

2.6. Milloni reaktsioon. Võtke kahte katseklaasi 5 tilka uuritavaid lahuseid ja kolmandasse 5 tilka 0,1%-list fenoolilahust. Lisage igasse katseklaasi 3 tilka Milloni reaktiivi ja kuumutage ettevaatlikult.

2.7. Diasoreaktsioon. Segage katseklaasides 0,5 ml diaso I ja II lahuseid ning lisage segu leelistamiseks 0,5 ml 10%-list Na_2CO_3 . Järgnevalt lisage pisut uuritavat lahust.

2.8. Pliiatsetaadiireaktsioon. Võtke katseklaasidesse 1 ml uuritavaid lahuseid, lisage 1 ml konts. KOH (või NaOH) ja 1 tilk $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ -lahust. Loksutage ja kuumutage gaasileelil.

Töö nr. 3. Valgu kvantitatiivne määramine Lowry jt. meetodil

Töö eesmärgiks on omandada võtted standardgraafiku valmistamiseks ja selle alusel uuritavas lahuses valgu hulga määramiseks.

T ö ö k ä i k

3.1. Reaktiivi C valmistamine. Reaktiivi C tuleb valmistada vahetult enne määramist. Selleks segage reaktiiv A (2% Na_2CO_3 , 0,1 N NaOH -s) ja reaktiiv B (0,5% CuSO_4 , 5 H_2O 1%-lises K-tartraadis või K-tsitraadis) vahekorras 50:1. Antud katse tarvis tuleks segada 25 ml reaktiivi A ja 0,5 ml reaktiivi B.

3.2. Valgulahuse lahjenduste rea valmistamine standardgraafiku saamiseks. Võtke 4 katseklaasi ja mõõtke igaühte täpselt 1 ml destilleeritud vett. Esimesse lisage 1 ml lahust nr. 1 (sisaldab 80 μg valku 0,3 ml-s) ja segage hästi läbi. Järgnevalt viige puhta pipetiga sellest katseklaasist 1 ml lahust teise katseklaasi, segage hoolikalt ja viige puhta pipetiga 1 ml lahust kolmandasse katseklaasi. Peale segamist viige sealt 1 ml lahust neljandasse katseklaasi, segage hoolikalt ning eemaldage sealt 1 ml lahust. Sel viisil saame valgulahuse lahjenduste rea 1:2, 1:4, 1:8 ja 1:16 standardgraafiku

valmistamiseks.

3.3. Standardgraafiku valmistamine ning selle abil uuritava lahuses valgu hulga leidmine. Võtke 6 paari puhtaid katseklaase. Esimese paari klaasidesse pipeteerige valgulahuse lahjendusest 1:2 0,3 ml lahust, teise paari 0,3 ml lahjendusest 1:4, kolmandasse paari 0,3 ml lahjendusest 1:8 ja neljandasse paari 0,3 ml lahjendusest 1:16. Viiendasse paari pipeteerige 0,3 ml uuritavat lahust (lahus nr. 2). Kuues katseklaaside paar jääb kontrolliks, mistõttu neisse pipeteeriga 0,3 ml dest. vett. Järgnevalt lisage esimesse katseklaasi 1,5 ml reaktiiv C ja segage hoolikalt, täpselt minuti pärast lisage teise katseklaasi 1,5 ml reaktiiv C, siis minuti pärast kolmandasse jne.

Täpselt 10-ndal minutil (pärast reaktiiv C lisamist) viige 0,1 ml Folin-Ciocalteu reaktiiv esimesse katseklaasi (hoolikalt segadal), minuti pärast teise katseklaasi, siis minuti pärast kolmandasse jne.

30-ndal minutil (arvestatuna Folin-Ciocalteu reaktiiv lisamisest) mõõtke esimese klaasi näit (ekstinktsioon, optiline tihedus) 750 nm juures fotoelektrilises kolorimeetris, kasutades punast filtrit. Minuti pärast mõõtke teise katseklaasi ekstinktsioon, seejärel minuti pärast kolmanda jne. Järgnevalt arvutage kõikide paaride (nn. paralleelide) keskmised näidud ja lahutage katsepaaride keskmisest maha kontrollpaari (6. katseklaaside paar) keskmine. Kandes ordinaatteljele nelja esimese katsepaari keskmised näidud ja abtsisisteljele neile vastavad valgu hulgad 0,3 ml-s (need on vaja arvutada, võttes aluseks lahuse nr. 1 valgusisalduse 0,3 ml-s ja lahjenduse suurused), saame valmistada standardgraafiku, mille abil, kandes ordinaatteljele uuritava lahuse ekstinktsiooni, saame leida abtsisisteljel valgu hulga uuritava lahuse 0,3 ml-s.

Lowry jt. meetodi kasutamisel on vajalik arvestada:

a) Kui uuritavas lahuses on väga vähe valku, võib tundlikkuse tõstmiseks reaktiiv C segada nii, et A ja B suhe oleks 10:1.

b) Rida ühendeid mõjutavad katsetulemused. Alljärgnevalt on toodud segavate ühendite kontsentratsioon, millest allpool

nad enam ei sega valgu määramist Lowry jt. meetodil:

karbamiid (0,5%)	ZnSO_4 (0,1%)
guanidiin (0,5%)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,2%)
triklooraadiikhape (0,5%) (neutraliseeritud)	$\text{Ba}(\text{OH})_2$ (0,5%)
atsetoon (0,5%)	Na_2SO_4 (1,0%)
sahharoos (3,5%)	NaNO_3 (1,0%)
etanool (5,0%)	eeter (5,0%)

Fosfaatpuhvrid kontsentratsioonis üle 0,1 M põhjustavad sademe teket.

Lisades vastava segava faktori standardgraafiku valmistamisel kasutatavasse lahusesse on võimalik segava faktori efekt mõõtmistulemustest välja lülitada.

Töö nr. 4. Aminohapete kromatograafiline lahutamine

Kui kromatograafia meetodeid liigendada lahusti (liikuv faasi) liikumissuuna alusel, saame rääkida tõusvast, laskuvast, ühemõõtmelisest, kahemõõtmelisest ja radiaalsest kromatograafiast. Antud töös rakendatakse radiaalset kromatograafiat (jaotuskromatograafia) AH-te segu lahutamiseks. AH-te lahutumise aluseks on nende erinev jaotumine kahes osaliselt segunevas vedelikus - vees ja veega küllastatud orgaanilises lahustis - fenoolis. Mida hüdfoobsem on AH, seda paremini lahustub ta apolaarses lahustis (fenoolis) ning seda kiiremini liigub ta Petri tassis oleval kromatograafia paberil. Lõppkokkuvõttes kantakse AH-d stardipunkti teatud kaugusele, kus nad avastatakse ninhüdrinireaktsiooniga.

Töö kõik

Tehke kromatograafiapaberist ketta (\varnothing 12 cm) tsentrisse väljalõige, mis jääb ketta jalakeseks. Jagage ketta piki diagonaale 4-ks sektoriks, tehke igasse sektorisse ringike (kettast tsentrist 1 cm kaugusele) ning tähistage see numbriga. NB! Kõik operatsioonid tehke hariliku pliatsiga, hoides kettast servadest, vältimaks sõrmejälgede teket kromatogrammil.

Kandke peenikese kapillaari abil esimesse kolme ringikesse veidi vastavat test-AH-t (Ala, Glu, Leu) ja neljandasse ringikesse uuritavat lahust (jälgi, et pealekantav lahust

ei väljuks ringikesest). Laske kettal kuivada 10 min.

Valage Petri tassi 10 ml veega küllastatud fenoolilahust, asetage ketas jalakesega lahusesse, sulgege Petri tass ning teostage 40-50-minutilise kromatografeerimine. Kui lahusti front on jõudnud peaaegu ketta ääreni, eemaldage Petri tassi kaas, võtke pintseti abil ketas ja asetage ta Petri tassi kaanele, mis järgnevalt viige 10 minutiks termostaati ($90-100^{\circ}\text{C}$), et eemaldada fenooli jäägid ja fikseerida AH-d.

Kromatogrammi saamiseks pritsige ketast 0,2%-lise nin-hüdrini alkoholilahusega ja kuivatage teda 5 min. $90-100^{\circ}\text{C}$ juures. Võrrelge test-AH-te ja uuritava segu komponentide liikuvust ja arvutage R_f vastava komponendi jaoks (vt. praktikum nr. 1).

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Millel baseerub Kjeldahli meetod?
2. Millised AH-d esinevad želatiini koosseisus?
3. Kuidas konstrueeritakse standardgraafikut valgu hulga leidmiseks Lowry jt. meetodil?
4. Mis on AH R_f ja kuidas teda leitakse?

Töö nr. 5. Valkude happeline hüdroolüüs ja formoolitiitrimine Sørenseni järgi

Valkude hüdroolüüs on oluline võte nende primaarstruktuuri selgitamisel. Et hüdroolüüsi käigus Trp lõhnustub täielikult, mõned AH-d (Ser, Thr, Cys, Tyr) osaliselt, siis praktikas kombineeritakse happelist hüdroolüüsi ensümaatilisega. Valkude happelisi ja ensümaatilisi hüdroolüsaate kasutatakse ka ravimpreparaatidena parenteraalseks toitmiseks.

Antud töö eesmärgiks on munavalgu happelise hüdroolüüsi läbiviimine ning selle kulu hindamine formoolitiitrimise (hüdroolüüsil vabanenud $-\text{COOH}$ hulga määramine) ning biureedireaktsiooni abil.

T ö ö k ä i k

Mõõtke ümarapõhjalisse kolbi 20 ml munavalgu lahust ja lisage 5 ml kontsentreeritud soolhapet. Sulgege kolb korkiga, mida läbib pikk klaastoru (õhkjahuti), ja asetage kolb asbestvõrgule, kinnitades teda statiivile. Keetke kolvi sisu 30 või 80 minutit (alates keemise algusest).

Teostage vabade $-\text{COOH}$ tiitrimine:

a) hüdrolüsumata munavalgu lahuses. Viige 1 ml munavalgu lahust väikesse kolbi, lisage 5 tilka 20%-list formalini neutralset lahust ja 3 tilka fenoolftaleiini ning tiitrige mikrobüretist 0,05 N NaOH lahusega püsiva kahvatu roosa värvuse tekkeni. Registreerige kulunud NaOH hulk.

b) valgu hüdrolüsaadis. Katkestage hüdrolüüs 30 (või 80) minuti möödudes ja eemaldage kolvilt jahutustoru. Lisage spaatliga veidi loomset sütt häduse lahuse valastamiseks, segage lahust ja keetke veel 5 minutit. Jahutage hüdrolüsaat, valage ta mõõtkolbi, viige maht destilleeritud vee abil 25 ml määrgini ning filtri ge lahust läbi. NB! Kui praktikumis on valmis hüdrolüsaat, siis jääb eelnev osa ära!

Mõõtkolbi 1,25 ml hüdrolüsaati (et 20 ml valgulahust vastab 25 ml-le hüdrolüsaadile, siis 1 ml valgulahust - 1,25 ml-le hüdrolüsaadile), lisage 3 tilka fenoolftaleiini ja neutraliseeri ge keskkonnas olev HCl 10%-lise NaOH lahusega makrobüreti abil (nõrga roosa värvuse tekkeni). NB! Neutraliseerimiseks kulunud NaOH hulka arvesse ei võeta. Kui neutraliseerimisel tekkis tugevalt punane värvus, siis lisage tilkhaaval (segadalt) 1%-list etanahapet, kuni lahust muutub värvusetuks. Etanahappe liig neutraliseeri ge 1%-lise NaOH lahusega (tekib nõrk roosa värvus). Lisage 5 tilka 20%-list formaldehüüdi neutralset lahust ja tiitri ge 0,05 N NaOH lahusega kuni kahvatu roosa värvuseni. Teades, et tiitritavate -COOH hulk on ekvivalentne formaldehüüdiga seostunud -NH₂ hulgaga, arvutage -NH₂ lämmastiku hulk valgulahuse ja hüdrolüsaadi jaoks (NB! 1 ml-le 0,05 N NaOH lahusele vastab 0,07 mg lämmastikku).

Võrrelge valgulahuse ja hüdrolüsaadi biureetreaktsiooni. Selleks võtke 0,5 ml uuritavat lahust (hüdrolüsaadi puhul neutraliseeri ge see 10%-lise NaOH lahusega), lisage 0,5 ml 10%list NaOH, loksutage ja lisage 1-2 tilka 1%-list CuSO₄.

Töö nr. 6. Valkude sadestamine

Valkude sadestamist kasutatakse mitmetel praktilistel eesmärkidel, nagu:

- 1) valkude puhastamisel (vt. fraktsioneeriv ja isoelektriline sadestamine; sadestamine orgaaniliste lahustitega);
- 2) biovedelike (veri, uriin, piim) vabastamiseks valkudest, kui nad segavad vastavaid analüüse;

- 3) valgu avastamiseks uriinis;
- 4) ensüümreaktsioonide peatamiseks;
- 5) meditsiinis põletushaavade töötlemiseks tanniiniga, mis kalgendab pindmised koervalgud ja ei teki nende toksilisi laguprodukte.

Neutraalsoolade kõrgete kontsentratsioonide (ioontugevuste) juures sadeneb valk lahusest pöördvalt välja (toimub dehüdratatsioon ning laengute neutraliseerimine) ja seda nim. väljasoolamiseks. Erinevad valgud sadenevad välja antud soola erinevatel ioontugevustel, sest väljasoolamisele mõjuvad valgude hüdrofiilsus, M_r , laeng.

Antud töö eesmärgiks on albumiinide ja globuliinide eraldamine väljasoolamisega erineva ioontugevuse juures, väljasoolamise pöörduvuse ja kvantitatiivsuse tõestamine ning rea denatureerivate faktorite toime uurimine.

T ö ö k ä i k

a) Albumiinide ja globuliinide väljasoolamine

Mõõtke kahte katseklaasi 2 ml vereseerumit (või munavalgu lahust) ning lisage esimesse klaasi 2 ml küllastatud $(NH_4)_2SO_4$ lahust (tekib poolküllastus), teise tahket NaCl kuni küllastuseni. Loksutage mõlemat katseklaasi ja jälgige globuliinide sademe teket. Filtreerige katseklaaside sisu kahte puhtasse katseklaasi ning lisage esimesse filtraati tahket $(NH_4)_2SO_4$ kuni küllastatuseni, teise aga 4–6 tilka 0,1%-list etanahapet. Filtreerige esimesest katseklaasist tekkinud albumiinide sade välja ja kontrollige biureedireaktsiooni abil mõlemas filtraadis valgu olemasolu.

b) Väljasoolamise pöörduvuse tõestamine

Mõõtke kahte katseklaasi 2 ml vereseerumit (või munavalgu lahust) ning lisage esimesse 2 ml alkoholi ja veidi 10%-list NaCl, teise 2 ml küllastatud $(NH_4)_2SO_4$ lahust. Loksutage hoolikalt katseklaase. Peale sademe teket lisage mõlemasse 4–5 ml dest. vett ning loksutage uuesti.

c) Valgude denatureerimine

Mineraalhapete toime. Võtke kolm katseklaasi ning viige igasse katseklaasi 15 tilka vastavat konts. hapet: esimesse H_2SO_4 , teise HCl ja kolmandasse HNO_3 . Hoides katseklaase 45° nurga all lisage igasse katseklaasi (mööda klaasi seina) 10 tilka valgulahust nii, et vedelikud ei seguneks. Vedelike

piirpinnal tekib valge rõngakujuline sade. Tekitage vastavasse katseklaasi vastava konts. happe lisamisega (umbes 20 tilka) happe liig. NB! Sade ei lahustu (hüdrolüüsi tõttu) vaid konts. HNO_3 liia puhul. Valgu avastamiseks uriinis kasutataksegi kvalitatiiivset proovi konts. HNO_3 -ga.

Leeliste toimed. Võtke katseklaasi 5 tilka valgulahust ja lisage 5 tilka konts. NaOH või KOH . Miks leelise toimed valk ei sadene?

Raskemetallide soolade toimed. Võtke kolme katseklaasi 10 tilka munavalgu lahust. Lisage esimesse katseklaasi 1-2 tilka CuSO_4 lahust, teise 2 tilka ZnSO_4 lahust ja kolmandasse 2-3 tilka AgNO_3 lahust. Kõikides katseklaasides tekivad vees lahustumatud sademed, mis aga lahustuvad raskemetallisoola lahuse liia puhul (v.a. AgNO_3). Raskemetallide soolad sadestavad valke (tekivad soolalaadsed ja kompleksühendid) juba madalatel kontsentratsioonidel.

Temperatuuri toimed. Kõrgete temperatuuride toimed valgud denatureeruvad, kuna makrostruktuuri muutuste tõttu hüdrofiilsed valguosakesed muutuvad hüdrofoobseteks. Temperatuurist tingitud koagulatsioonikiirus sõltub keskkonna pH-st, ioontugevusest ja valgu loomusest.

Võtke 5 katseklaasi ja viige igasse 2 ml munavalgu lahust. Lisage teise katseklaasi 1 tilk 1%-list etaanhapet, kolmandasse katseklaasi 0,5 ml 10%-list etaanhapet, neljandasse 0,5 ml 10%-list etaanhapet ja 3-4 tilka NaCl küllastatud lahust ning viiendasse 0,5 ml 10%-list NaOH . Keetke kõiki katseklaase. Esimeses katseklaasis sadeneb valk järkjärgult, teises kiiremini ja täielikumalt (pI), kolmandas sadet ei teki (positiivsed laengud), neljandas tekib sade (neutraalsoola lahus võimaldab koagulatsiooni), viiendas ei teki sadet (negatiivsed laengud).

Alkaloidsadestavate reagentide toimed. Valgud astuvad reaktsiooni ka alkaloidsadestavate reagentidega (sulfosalitsüülhape, pikriinhape, KI , HgI_2 , BiI_3 , punane veresool, tanniin jt.) tingimustes (happeline keskkond), kus valk esineb anioonses vormis ja sadestav reagent katioonses vormis. Tekkivad soolataolised ühendid lahustuvad leeliselises keskkonnas.

Võtke 2 katseklaasi, viige kummassegi 2 ml valgulahust ning lisage 2-3 tilka 1%-list etaanhappelahust. Esimesse

katseklaasi lisage 2-3 tilka küllastatud tanniinilahust ja teise 5-6 tilka küllastatud pikriinhappelahust.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Millel baseerub formoolitiitrimise meetod?
2. Iseloomustage valgu täieliku hüdrolüüsi produktide biureedireaktsiooni.
3. Milliste faktoritega saab valke sadestada pöördvalt ja millistega pöördumatult? Kuidas tõestada pöörduvat sadenemist?
4. Miks sadestab NaCl valke nõrgemini kui $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$?
5. Kuidas tõestada valkude kvantitatiivset sadenemist?
6. Miks on valkude sadestamiseks alkaloidide reagentidega vajalik happeline keskkond?

Töö nr. 7. Süsivesikute keemilised reaktsioonid

SV-te reaktsioonid tulenevad alkoholrühma ja karbonüül-rühma olemasolust.

Antud praktilise töö eesmärgiks on tutvumine keemiliste reaktsioonidega, mida kasutatakse eeskätt SV-te kvalitatiivseks määramiseks.

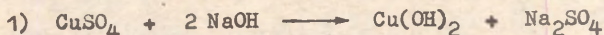
I Oksüdeerimisreaktsioonid. Monoosid (aga ka osa disahhariide), sisaldades poolatsetaalset hüdroksüülrühma (või vaba karbonüülrühma), oksüdeeruvad aluselises keskkonnas raskmetallide soolade toimele. Et viimased redutseeruvad seejuures metallideks või nende oksiidideks, siis räägitakse SV-te taandavast võimest.

Järgnevad oksüdeerimisreaktsioonid teostage kõigi praktikumis olevate SV-te lahustega. Negatiivse reaktsiooni puhul teostage eelnevalt vastava SV hüdrolüüs (lisage mõni tilk konts. HCl ja keetke veidike aega). Katsete tulemused kandke koondtabelisse ja andke neile ka vastav põhjendus.

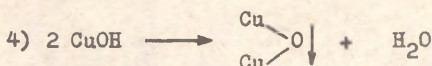
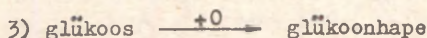
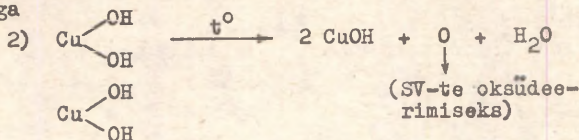
T ö ö k ä i k

1. Trommeri reaktsioon. Põhineb vask (II) hüdroksiidi taandumisel vask (I) oksiidiks. Leelistage SV-te lahused (5 tilka) võrdse hulga 10%-lise NaOH-ga, lisage 1-2 tilka 0,2 N vasevitrioli (CuSO_4) lahust ja kuumutage segu keemiseni (NB! mitte keeta). Positiivse reaktsiooni puhul tekib punakas või punakas-kollakaspruun Cu_2O sade.

Reaktsiooni skeem:

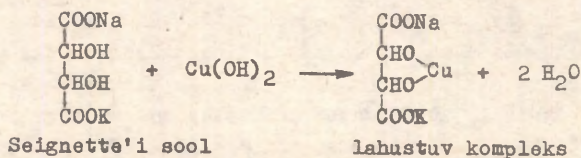


Tekkiv Cu(OH)_2 sade lahustub komplekseerumisel SV-te OH-rühmadega



NB! CuSO_4 lisamisega tuleb olla ettevaatlik, sest viimase liig maskeerib reaktsiooni (taandumata Cu(OH)_2 muutub kuumutamisel mustaks CuO sademeks).

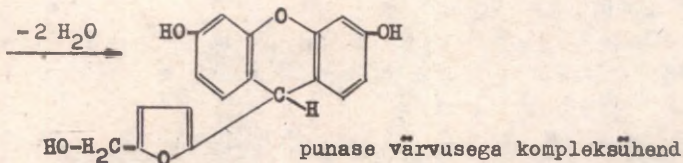
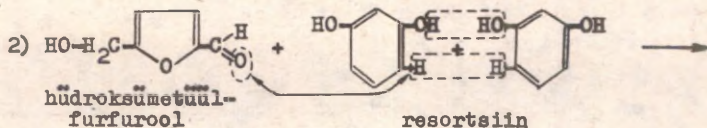
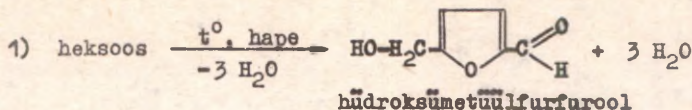
2. Fehlingi reaktsioon. Trommeri reaktsiooni variant. Fehlingi reaktiivis sisalduv Seignette'i sool hoiab Cu(OH)_2 lahustununa, mis tõstab reaktsiooni tundlikkust. Lisage uuritavatele lahustele võrdne hulk Fehlingi reaktiivi (Cu(OH)_2 ja Seignette'i soola lahustuv kompleks) ja soojendage keemiseni. Positiivset reaktsiooni näitab tekkiv punane sade.



II Identifitseerimisreaktsioonid. Need spetsiifilised reaktsioonid võimaldavad kindlaks teha konkreetsete SV-te olemasolu biovedelikes.

1. Selivanovi reaktsioon heksoosidele. Reaktsioon baseerub sellel, et tugeva happe toimel tekib heksoosist hüdroksümetüülfurfurool, mis resortsiiniga annab septsiihilise punase värvuse. Reaktsioon toimub eriti hästi fruktoosiga või kõrgemate SV-ga, mis hüdrolüüsil annavad fruktoosi (näit. sahharoos, inuliin), kuna ketoheksoosidest tekib hüdroksümetüülfurfurool umbes 20 korda kiiremini kui aldoheksoosidest (glükoos, galaktoos, mannoos).

Reaktsiooni kemism:



T ö ö k ä i k

Võtke katseklaasi 1-2 ml Selivanovi reaktiivi (0,5%-line resortsiinilahus 20%-lises HCl-s), lisage 2-3 tilka fruktoosilahust, kuumutage segu keemiseni ja jälgige punase värvuse teket. Kestvamaal keetmisel annavad Selivanovi reaktsiooni ka glükoos, maltoos, sahharoos.

2. Spetsiifilised reaktsioonid pentoosidele. Need reaktsioonid baseeruvad sellel, et tugeva happe toimel tekib pentoosist furfurool (O=C1C=CC(=O)O1), mis vastavate reagentidega annab teatud värvusi.

a) Reaktsioon orsiiniga (metüüldihüdroksübenseen)

T ö ö k ä i k

Võtke katseklaasi 2-3 ml 1%-list pentoosilahust, lisage võrdne hulk 20%-list HCl ja mõni kristall orsiini. Peale hoolikat segamist kuumutage segu keemiseni, tekib rohekas värvus.

b) Reaktsioon floriglutsiiniga (trihüdroksübenseen)

T ö ö k ä i k

Kuumutage 1-2 ml floriglutsiinilahust (0,2%-line floriglutsiin konts. HCl-s) keemiseni ja lisage siis kiiresti 5-6 tilka pentoosilahust. Moodustub punane kompleksühend.

c) Reaktsioon aniliiniga (aminobenseen)

T ö ö k ä i k

Lisage 2-3 ml-le 1%-lisele pentoosilahusele võrdne hulk

30%-list HCl, kuumutage keemiseni ning lisage mõni tilk aniiliini ja jää-äädikhapet. Tekib punase värvusega ühend.

3. Jooditest. Lugoli lahuse (I_2 on lahustatud KI-is) toimel annab tärklis sinise või sinakasvioletse värvuse, mis kaob kuumutamisel. Tärklise osalise hüdroolüüsi produktid (erütrodekstriinid) annavad jooditesti puhul punase värvuse, lõpliku hüdroolüüsi saadused (maltoos ja glükoos) spetsiifilist värvust ei anna. Glükogeen annab joodiga punakaspruuni värvuse.

T ö ö k ä i k

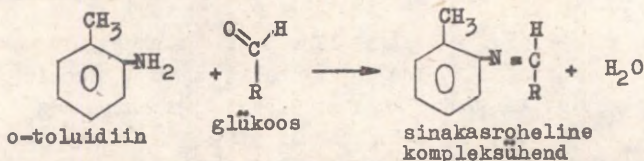
Lisage uuritavate SV-te lahustele (tärklis, glükogeen, glükoos, sahharoos) 1-2 tilka Lugoli lahust ja võrrelge tekkivaid värvasi.

Töö nr. 8. Glükoosi kvantitatiivne määramine veres ja bioloogilistes vedelikes

Vere glükooisisalduse määramiseks kasutatakse järgmisi meetodeid.

1. Meetodid, mis baseeruvad SV-te võimel taandada raskmetallide sooli leeliselises keskkonnas. Nendest enamkasutatavaks on Hagedorn-Jenseni meetod (vt. SV-te metabolism).

2. Kolorimeetrilised meetodid. Baseeruvad glükoosi ja vastavate reagentide interaktsioonil tekkivate ühendite värvuse intensiivsuse määramisel. Nendest levinuim on ortotoluidiini meetod. Tema põhimõtte seisneb selles, et glükoosi kuumutamisel o-toluidiiniga äädikhappe lahuses tekib sinakasroheline värvus, mille intensiivsus sõltub lineaarselt glükoosi kontsentratsioonist lahuses.



Ortotoluidiiniga reageerivad peale glükoosi ka teised aldoheksoosid (galaktoos, mannoos jt.), kuid kuna nende sisaldus veres on väike, siis määratakse tegelikult ainult glükoosisisaldust. Nimetatud meetod on küllaldaselt täpne.

T ö ö k ä i k

Valage kahte tsentrifuugiklaasi 0,9 ml 3%-list CCl_3COOH ,

lisage esimesse 0,1 ml sõrmest võetud verd ja teise 0,1 ml glükoosi standardlahust ning peale segamist tsentrifuugige segu 3000 p/min 10 min. Võtke mõlemast klaasist 0,5 ml supernatanti kahte kuiva katseklaasi, lisage mõlemale 4,5 ml ortotoluidiinset reaktiivi ning asetage klaasid keevasse veevanni (NB! täpselt 8-ks minutiks!). Jahutage klaasid kraaniveega toatemperatuurini, mõõtku proovide optiline tihedus punase valgusfiltriga (620 nm juures) 1 cm küvettidega FKK-1 abil (kontrolliks võtke destilleeritud vett) ning arvutage glükoosisisaldus veres järgmise valemi abil:

$$C = \frac{C_{st} \cdot E}{E_{st}}, \text{ kus}$$

C - glükoosi kontsentratsioon (mmool/l) uuritavas proovis

C_{st} - glükoosi kontsentratsioon standardlahuses (mg/100 ml)

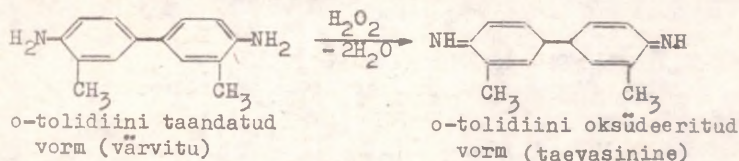
E - uuritava proovi optiline tihedus

E_{st} - glükoosi standardlahuse optiline tihedus.

SI ühikutele (mmool/l) ülemineku koefitsient on 0,0555.

Vere glükoosisisaldus on antud meetodi puhul 60-90 mg% (3,33-4,99 mmool/l).

3. Ensümaatilised meetodid. Baseeruvad glükoosi metabolismis osalevate ensüümide kasutamisel. Kõige spetsiifilisem ja täpsem on glükoosi oksüdaasi meetod. Flavoproteiidne glükoosi oksüdaas (koensüümiks on FAD) oksüdeerib glükoosi läbi δ -D-glükonolaktooni glükoonhappeks. Glükoosilt eraldunud 2 vesinikuaatomit kantakse FAD-i abil õhuhapnikule ning moodustub H_2O_2 (ekvimolaarselt oksüdeeritud glükoosiga). Vastava peroksüdaasi juuresolekul oksüdeerib H_2O_2 värvitu o-tolidiini värviliseks, kusjuures värvuse intensiivsus on lineaarses sõltuvuses keskkonnas oleva glükoosi hulga.



Glükoosi määramiseks sadestatakse vere valgud tsinksulfaadi leeliselise lahusega. Meetodit ei sega vere teised taandavat võimet evivad komponendid. NB! Katses kasutada ainult kuivi katseklaase ja pipette.

Töö käik

Võtke kahte tsentrifuugiklaasi 1,1 ml 0,9%-list NaCl lahust, 0,4 ml 5%-list $ZnSO_4$ lahust ja 0,4 ml 0,3 N NaOH lahust, 0,1 ml verd ning peale hoolikat segamist ja 10 min. seismist eemaldage valgud, tsentrifuugides segu 10 min. (2500-3000 p/min). Lisage 1 ml tsentrifugaadile 3 ml toatemperatuurini viidud töölahust ja segage hoolikalt. Teise katseklaasi (kontrollkatse) võtke 1 ml destilleeritud vett ja lisage samuti 3 ml töölahust. Mõõtke mõlemate lahuste optiline tihedus täpselt 15 min. möödudes PEK-i abil 630 nm juures (punane valgusfilter) ja arvutage glükoosi kontsentratsioon veres, kasutades kalibreerimisgraafikut.

Terve inimese vere glükoosisisaldus antud meetodiga määramisel on 3,10-5,22 mmool/l (56-94 mg%). Kui määrata glükoosisisaldus plasmas või seerumis, saame tulemuseks 3,05-5,55 mmool/l (55-100 mg%), seljaajuvedeliku puhul - 2,77-3,88 mmool/l (50-70 mg%).

Veresuhkru määramise kliinilis-diagnostiline tähtsus

Hüperglükeemiat (s.o. veres glükoosisisalduse tõus) täheldatakse suhkruhaiguse, akuutse pankreatiidi, pankrease tsirrooside, emotsionaalse stressi, kilpnäärme, hüpofüüsi ja neerupealiste hüperfunktsiooni puhul. Selline seisund tekib ka peale eeternarkoosi ja suure hulga SV-te saamisel toiduga. Hüperglükeemia esineb insuliini liigsel manustamisel suhkruhaiguse ravimisel, maksa parenhüümi kahjustuste, glükogeeni lõhustavate ensüümide tegevuse häirumise, kilpnäärme, hüpofüüsi ja neerupealiste hüperfunktsiooni, suurte verekaotuste, SV-te imendumise häirete, benseeni, kloroformi ja fosfori mürgistuste ning nälguse puhul.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Selgitage Trommeri, Fehlingi ja Nylanderi reaktsioonide olemust.
2. Nimetage reaktsioone, mille abil saab kvalitatiivselt tõestada sahharoosi, maltoosi, heksoose ja pentoose. Põhjendage nende kasutamist.
3. Milliseid meetodeid kasutatakse SV-te kvantitatiivseks määramiseks?

Töö nr. 9. Lipiidide ekstraheerimine ajukoest

Ekstraheerimist teostatakse Soxhleti aparaadi (koosneb kolmest osast - kolvist, ekstraheerimistorust, jahutist) abil.

T ö ö k ä i k

Kandke filterpaberist valmistatud hülssi 20 g kuivatatud ajusubstantsi ja asetage see ekstraheerimistorusse. Valage kolbi 150 ml alkoholi, ühendage aparaadi osad ja paigutage aparaat statii vi abil elektrisoojendile. Aurustuv alkohol, kondenseerudes jahutis, koguneb ekstraheerimistoru põhja, kust ekstraheerib ajukoest lipiide. Vajaliku nivoo saabumisel alkohol voolab sifoontoru mööda kolbi tagasi ja ekstraktisioon kordub. Teostage ekstraheerimist 2-3 tundi ja lõpetage protsess siis, kui suurem osa alkoholist on ekstraheerimistorus, kolvis on aga lipiidide kontsentraat.

Töö nr. 10. Fosfatidüülkoliini (letsitiini) sadestamine, hüdroolüüs ja koostisosade tõestamine

T ö ö k ä i k

Lisage töös nr. 9 saadud ekstraktile atsetooni, kuni tekib letsitiini sade (erinevalt teistest lipiididest letsitiin atsetoonis ei lahustu). Eraldage letsitiini sade filtrimise teel (filtraat säilitage tööks nr. 11), kandke sade filterpaberilt (klaaspulgaga) kuiva katseklaasi, lisage 5-6 ml 10%-list KOH ja keetke vesivannil 15 min. Tõestage hüdroolüüs saadis letsitiini komponendid. (NB! Vabanev koliin muutub trimetüülamiiniks $N(CH_3)_3$, mis on äratuntav spetsiifilise lõhna järgi).

Letsitiin + 3 HOH \rightarrow glütserool + rasvhapped + koliin + H_3PO_4
Rasvhapete tõestamine. Lahjendage letsitiini hüdroolüsaati väheste veega ja hapustage konts. HCl-ga. Eraldage filtreerimise teel sadenenud rasvhapped.

Glütserooli tõestamine. Neutraliseerige eelmises katses saadud filtraat 10%-lise NaOH-ga, kandke portselankaussi ja aurutage ta vesivannil kuivaks. Kuivjäägi ühele osale (teine osa jääb H_3PO_4 tõestamiseks) lisage tahket $KHSO_4$ ja kuumutage. Glütserooli olemasolu tõestab tekkiv kergesti lenduv terava lõhnaga akroleiin.

H_3PO_4 tõestamine. Kuumutage eelmises katses saadud kuivjää-

ki suures katseklaasis (või Kjeldahli kolvis) 1 ml konts. H_2SO_4 -ga, kuni segu muutub värvusetuks (mineraliseerumise kiirendamiseks lisage mõni tilk H_2O_2). Peale segu jahtumist lisage 5 ml dest. H_2O , 2 ml 5%-list ammoniummolübdiaadilahust ja 2 ml küllastatud tiokarbamiidilahust. H_3PO_4 (täpsemalt Pi) olemasolu tõestab tekkiv molübdensinine.

Töö nr. 11. Kolesterooli tõestamise reaktsioonid

Kolesterooli saab tõestada kristalliseerimisega või värvusreaktsioonide abil. Viimasel juhul viiakse kloroformilahuses olev alkohoolne kolesterool vee eraldumisega küllastumata süsivesinikuks.

T ö ö k ä i k

a) Kristalliseerimine. Võtke portselankaussi töös nr. 10 saadud filtraati ja aurutage see vesivannil kuivaks. Viige klaaspulgaga vähene kogus kuivjääki alusklaasile, lisage tilk tulist alkoholi ning peale lahustit aurumist vaadeldge kolesterooli kristalle mikroskoobi all. Joonistage kristallide ehitus protokollide vihikusse.

b) Liebermann-Burchardi proov. Võtke 0,5 g ajukude, lisage 1 g kipsi ja peenestage segu uhmris homogeenseks massiks. Määrige see mass skalpelli abil õhukese kihina esemeklaasile ja kuivatage $60^{\circ}C$ juures (selleks hoidke esemeklaasi 20 cm kaugusel põleti leegist, kontrollides aegajalt klaasi kuumust käeseljal). Viige kogu kuivmass skalpelli abil katseklaasi, lisage 2,5 ml kloroformi ja ekstraheerige kolesterool, loksutades pidevalt katseklaasi sisu 5 min väitel toatemperatuuril. Filtreerige kolesterooli kloroformekstrakt kuiva katseklaasi ja teostage Liebermann-Burchardi reaktsioon: lisage 1 ml-le filtraadile (kolesterooli kloroformilahus) 10 tilka äädikhappe anhütriidi ja kaks tilka konts. H_2SO_4 . Kolesterooli manulusel muutub lahus üle mitmete värvuste roheli-seks. Liebermann-Burchardi reaktsiooni kasutatakse kolesterooli kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks.

Töö nr. 12. Sapphapete tõestamine

Sapphapete tõestamiseks kasutatakse Pettenkoferi testi. Sapphapete ja hüdroksümetüülfurfurooli reageerimisel (viimane tekib sahharoosist konts. H_2SO_4 toimel) tekib punakasvioletne värvus. NB! Reaktsiooni segavad valgud, mis annavad analoogilise värvuse.

T ö ö k ä i k

Võtke katseklaasi 1 ml konts. H_2SO_4 , kihitage sellele 0,1 ml lahjendatud (1:5) sappi, millele on lisatud 1-2 tilka värskest valmistatud 20%-list sahharoosilahust ja jälgige lahuste kokkupuutepinnal värvuse teket.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Selgitage Soxhleti aparaadi tööprintsipi ja joonistage aparaadi skeem vihikusse.
2. Kirjutage (valemitega) letsitiini hüdrolüüsi reaktsioon.
3. Milliste reaktsioonidega tõestatakse glütserooli, kolesterooli, sapphappeid?
4. Nimetage kolesterooli kvantitatiivseks määramiseks kasutatavad reaktsioonid.

Töö nr. 13. Desoksüribonukleoproteiinide (DNP-de) isoleerimine ja DNA tõestamine

DNP-de allikatena on sobivaimad rakutuumarohked koed (põrn, harknäär, maks). DNP-de isoleerimine baseerub asjaolul, et nad moodustavad kõrge viskoossusega lahuseid suhteliselt kõrge kontsentratsiooniga soolalahustes (näit. 1 M NaCl-lahuses) ja sadenevad niitidena välja selliste lahuste lahendamisel (kuni 0,15 M).

T ö ö k ä i k

Tükeldage kaaridega 2 g maksa (põrna). Peenestage maksatükid võrdse hulga klaasipuru lisamisega jääl jahutatud uhmris, lisage seejärel järk-järguliselt 5 ml jahutatud 2 M NaCl lahust, mis sisaldab 0,04% Na-tsitraati (DNAasi inhibiitor), ja hõõruge segu 15 min vältel. Järgnevalt, segades uhmri sisu, lisage väheste portsjonite kaupa 50 ml jahutatud 1 M NaCl lahust. Saadud homogeenne mass kandke tsentrifuugiklaasidesse, tasakaalustage nad ja tsentrifuugige 15 min 3000 p/min. Valage supernatant mõõtsilindrisse, mõõtke keeduklaasi supernatandi suhtes kuuekordne maht dest. vett ning valage supernatant mõõtsilindrist väga aeglaselt peene joana vette, segades lahust pidevalt puupulgakesega. DNP sadeneb niitidena, mis keerduvad puupulgakesele. Kui niitide asemel tekib helbeline sade, laske sel pisut seista, valage ettevaatlikult vedelik pealt ära ja tsentrifuugige ülejäänud osa, saades DNP sademe.

DNA tõestamine. Viige pisut (ülejäanud osa jääb töö nr. 14 jaoks) desoksüribonukleoproteiinseid niite (sadet) katseklaasi ja lahustage 0,4%-lises NaOH-s. Lisage võrdne kogus difenüülamiinreaktiivi ja keetke segu 20 min. vesivannil. Hüdrolüüsil vabanenud DNA olemasolu tõestab sinise värvuse teke. Antud reaktsioon baseerub desoksüriboosil, mistõttu ta võimaldab eristada DNA-d RNA-st (riboosi olemasolul tekib roheline värvus).

Töö nr. 14. DNP komponentide tõestamine

Hüdrolüüs viiakse läbi H_2SO_4 -ga, mille toimel DNP lõplikult hüdrolüüsib lühikesteks peptiidideks, AH-teks ning N-alusteks, pentoosiks ja fosforhappeks.

T ö ö k ä i k

Viige töös nr. 13 saadud ülejäanud nukleoproteiinsed niidid (sade) hüdrolüüsikolbi, lisage 15 ml 10%-list H_2SO_4 , sulgege kolb korgiga, mida läbib pikk klaastoru (jahuti) ja keetke ettevaatlikult tund aega. Filtreerige jahtunud hüdrolüsaat läbi ja tõestage filtraadis ülalnimetatud hüdrolüüsiproduktid.

1. Pentoosi tõestamine. Pentoosi olemasolu tõestatakse kas orsiini või floriglutsiini abil (vt. SV-te identifitseerimisreaktsioonid).

2. Desoksüriboosi ja riboosi tõestamine. Lisage 5 tilgale hüdrolüsaadile 20 tilka difenüülamiini 1%-list lahust ja keetke segu vesivannil 15 min. Sinise värvuse teke tõestab desoksüriboosi olemasolu, roheline värvus - riboosi olemasolu.

3. Fosforhappe tõestamine. Lisage 10 tilgale hüdrolüsaadile 20 tilka molübdeenreaktiivi ja 20 tilka küllastatud tiokarbamiidilahust. Positiivset reaktsiooni näitab sinakasroheline värvuse teke.

4. Puriinaluste tõestamine. Lisage 10 tilgale hüdrolüsaadile umbes 10 tilka ammoniaagi kontsentreeritud lahust (kontrollige indikaatorpaberiga leeliselist reaktsiooni). Peale loksutamist lisage 10 tilka 2%-list hõbeda ammoniakaalset lahust ning laske segu 3-5 min. seista. Tekib helepruunikas puriinaluste hõbedasoolade sade.

5. Peptiidide tõestamine. Selleks kasutatakse biureedireaktsiooni (vt. valkude praktikum).

Kontrollkõõsimused laboratoorse töö kohta.

1. Millel baseerub DNP-de isoleerimine?
2. Nimetage DNP ja RNP hüdrolüüsi vahe- ja lõpp-produktid.
3. Milliste reaktsioonidega saame eristada DNA-d RNA-st ning tõestada pentoose ja puriinaluseid?

Töö nr. 15. Ensüümreaktsioonide kiiruse sõltuvus keskkonna faktoritest

NB! Kuna ensüümid on väga labiilsed ja spetsiifilised, siis praktiliste tööde läbiviimisel tuleb olla eriti hoolas, täpne ja täita eeskirjades toodud nõudeid.

1. Temperatuuri mõju E-mi (amülaas) ja anorgaanilise katalüsaatori (HCl) aktiivsusele. Tõrklis kui substraati hüdrolüüsivad nii sülje amülaas kui ka HCl. Hüdrolüüsi kulg on astmeline: tõrklis → lahustuv tõrklis → erütrodekstriinid → akrodekstriinid → maltoos → glükoos.

Hüdrolüüsiastet saab määrata: 1) Lugoli lahusega, mis on I₂ lahus KI-s (jooditest) - tõrklis ja lahustuv tõrklis annavad joodiga sinakasviolette värvuse (hüdrolüüsi pole toimunud); erütrodekstriinid annavad punase värvuse; akrodekstriinide, maltoosi ja glükoosi puhul joodi pruun värvus ei muutu (on toimunud hüdrolüüs); 2) Trommeri reaktsiooniga - positiivse Trommeri reaktsiooni annavad vaid maltoos ja glükoos (vt. süsivesikute praktikum).

T õ õ k ä i k

Võtke 8 katseklaasi ja viige igasse 5 ml 0,5%-list tõrkliselahust (vt. katse skeemi). Asetage katseklaasid nr. 1 ja 5 jäävanni (0°), nr. 2 ja 6 jätke toatemperatuuri juurde (18-20°), nr. 3 ja 7 pange termostaati (37°) ning nr. 4 ja nr. 8 asetage keevasse vesivanni (100°). 10 minuti möödudes, kui katseklaaside sisu on omandanud vastava temperatuuri, lisage katseklaasidesse nr. 1-4 1 ml 1:10 lahjendatud sülge ja katseklaasidesse nr. 5-8 1 ml 10%-list HCl, segage hoolikalt ning jätke vastava temperatuuri juurde 15 minutiks. Jahutage katseklaasid kiiresti jäävannis, jagage nende sisu pooleks ja sooritage ühe poolega koheselt jooditest 1-2 tilga Lugoli lahuse lisamisega. Teise osaga sooritage Trommeri reaktsioon (vt. praktikum nr. 3). Katse tulemused kanda protokollis koos vastavate kommentaaridega.

Katse skeem (kanda protokoll):

Nr.	Tärglis (ml)	Sülg (1:10) (ml)	10%-line HCl (ml)	Inkubat- siooni t°	Jooditest (+ või -)	Trommeri reaktsioon (+ või -)
1.	5	1	-	0°		
2.	5	1	-	20°		
3.	5	1	-	37°		
4.	5	1	-	100°		
5.	5	-	1	0°		
6.	5	-	1	20°		
7.	5	-	1	37°		
8.	5	-	1	100°		

2. pH mõju ensüümreaktsiooni kiirusele. Töö eesmärgiks on määrata sülgje amülaasi pH-optimum.

T ö ö k ä i k

Võtke 7 katseklaasi ning mõõtke nendesse puhverlahuste rida vastavalt skeemile:

pH	0,2 M Na ₂ HPO ₄ (ml)	0,1 M sidrunhape (ml)
5,6	0,58	0,42
6,0	0,63	0,37
6,4	0,70	0,30
6,8	0,77	0,23
7,2	0,87	0,13
7,6	0,94	0,06
8,0	0,97	0,03

Lisage igasse katseklaasi 1 ml 0,5%-list tärglise lahust 1%-lises NaCl-s ja 1 ml 1:100 lahjendatud sülgje, segage segu hoolikalt ning asetage katseklaasid 15 min 37°C juurde termostaati. Järgnevalt jahutage katseklaaside sisu, sooritage jooditest ning leidke selle alusel sülgje amülaasi pH-optimum.

3. Aktivaatori ja inhibiitori mõju sülgje amülaasile. Antud töö eesmärgiks on omandada amülaasi aktiivsuse määramise meetodika Wohlgemuthi järgi ja uurida aktivaatori ja inhibiitori toimet amülaasi aktiivsusele.

T ö ö k ä i k

Võtke 3 rida katseklaase (à 10) ning looge neisse lahjenduste rida (vt. skeem).

1. rida. Mõõtke igasse katseklaasi 1 ml dest. vett, lisage esimesse katseklaasi 1 ml 1:10 lahjendatud sülgje, segage hoolikalt ja viige 1 ml teise katseklaasi. Segage teises katse-

klaasis olev segu läbi, viige 1 ml segu kolmandasse katseklaasi, millest peale segamist viige 1 ml segu neljandasse katseklaasi jne. Viies 10-dast katseklaasist ära 1 ml segu, saate süljelahjenduste rea (vt. skeem).

2. rida. Mõõtke igasse katseklaasi 1 ml 1%-list NaCl-lahust, lisage esimesse 1 ml 1:10 lahjendatud sülge, segage hoolikalt ja viige 1 ml segu teise katseklaasi. Edasi toimige nagu 1. rea puhul.

3. rida. Mõõtke igasse katseklaasi 1 ml 1%-list CuSO_4 -lahust, lisage esimesse 1 ml 1:10 lahjendatud sülge, segage hoolikalt ning viige 1 ml teise katseklaasi jne. nagu eelmiste ridade puhul.

Järgnevalt lisage kõikidesse katseklaasidesse 2 ml 0,1%-list tärklielahust, segage ning inkubeerige neid termostaadis (37° , 30 min). Jahutage katseklaasid peale inkubeerimist, teostage jooditest, kandke tulemused protokolli ja arvutage amülaasi aktiivsus.

Amülaasi aktiivsust väljendatakse 0,1%-lise tärklielahuse hulga ml-tes, mille lõhustab 1 ml lahjendamata sülge 37°C juures 30 min. vältel. Normi korral on sülje amülaasi aktiivsus 160–320 ühikut. Wohlgemuth'i meetodit kasutatakse ka uriini ja vere amülaasi aktiivsuse määramiseks.

Näide. Oletame, et viimane negatiivse jooditestiga katseklaas 1. reas oli nr. 6. Amülaasi aktiivsus on seega $2 \cdot 640 = 1280$ ühikut, s.t. et 1 ml lahjendamata sülge suudaks neis tingimustes hüdrolyüsida 1280 ml 0,1%-list tärklielahust.

Katse skeem (kanda protokolli)

	Katseklaasi nr.										Amülaasi aktiivsus ühikutes
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Sülje-lahjendus	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	1 ml süljes
Jooditest (+ või -)	1. rida H_2O										
	2. rida 0,5%-line NaCl										
	3. rida 0,5%-line CuSO_4										

Töö nr. 16. Ensüümide kvantitatiivne määramine

1. Uriini amülaasi (diastaasi) määramine Büchneri järgi.

Meetod baseerub ajavahemiku leidmisel, mille vältel 1 ml uriini hüdrolüüsib tärglise täielikult. Tinglikult võetakse amülaasi aktiivsuse ühikuks E-mi hulk, mis 15 min. jooksul lagundab 2 mg tärglist.

T ö ö k ä i k

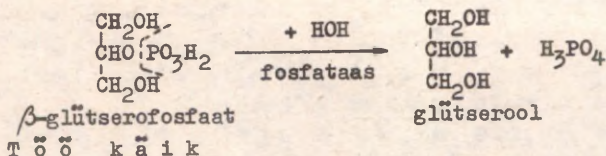
Kandke süstla abil üks tilk 0,1%-list joodilahust 0,2%-lises KI-dis (Lugoli lahús) kuivale Petri tassile 10-nesse erinevasse kohta. Järgnevalt võtke katseklaasi 2 ml 0,1%-list tärgliselahust (sisaldab 2 mg tärglist), 1 ml 0,85%-list NaCl-lahust ja asetage katseklaas termostaati (37°C) 5 minutiks. Nüüd lisage (katseklaas olgu termostaadis) 0,5 ml uriini ja märkige üles reaktsiooni alguse täpne aeg. Järgnevalt viige 3 min. möödudes tilk segu (Pasteur'i pipeti või klaaspulga abil) Petri tassil olevasse joodilahuse tilka, 6 min. möödudes teise joodilahuse tilka, 9 min. möödudes kolmandasse joodilahuse tilka jne, kuni jooditilga värvus jääb muutumatuks, ja fikseerige reaktsiooni aeg minutites. Arvutage uriini amülaasi aktiivsus vastava valemi abil: $x_u = \frac{15}{t \cdot 0,5}$,

kus 15 - aeg, mis on vajalik 2 mg tärglise täielikuks lõhustumiseks; 0,5 - uriini kogus (ml-tes), mis viidi reaktsioonisegusse; t - reaktsiooni kestus (min.); x_u - amülaasi aktiivsus ühes ml-s uriinis. Normi puhul on amülaasi aktiivsus (x_u) 1-2 ühikut. Wohlgemuth'i meetodi puhul (vt. töö nr. 15, kolmas osa, NaCl-rida) saadakse uriini amülaasi normaartuseks 16-64 U.

Normist kõrgemaid uriini amülaasi aktiivsusi täheldatakse pankreatiitide ägedas staadiumis. Lastel esineb amülaasi aktiivsuse kõrgenemine uriinis endeemiliste parotiitide korral, mil parotiidi viirus kahjustab ka pankreast. Amülaasi puudumine uriinis viitab neerude puudulikkusele.

2. Vereseerumi aluselise fosfataasi määramine. Aluseline fosfataas kuulub fosfomonoesteraaside (fosfataaside) hulka. Need ensüümid katalüüsivad süsivesikute ja fosforhappejäägi estrite (glükoos-1-P, glükoos-6-P jt.) hüdrolüüsi. Verre sa-tuvad need ensüümid luukoest, maksast, neerudest, põrnast, eesnärmest.

Aluselise fosfataasi pH-optimum on 8,5-9,0, happelisel fosfataasil 4,5-5,0. Mõlema E-mi määramisel kasutatakse S-na β -glütserofosfaati ning ensüümi aktiivsuse üle otsustatakse vabaneva fosfori hulga järgi (vt. reaktsioon):



Võtke kahte katseklaasi 0,1 ml vereseerumit ja 1 ml Tris-HCl puhvrit (pH = 9,1), mis sisaldab 25 mM β -glütserofosfaati ja 1 mM MgCl_2 (Mg^{2+} on fosfataaside aktivaatoriks). Esimesse katseklaasi (kontrollkatse) lisage 0,9 ml 10% triklooräädikhape lahust ning asetage mõlemad katseklaasid 1 tunniks termostaati (37°C). Peale katseklaaside jahutamist lisage teise katseklaasi (katse) 0,8 ml 10%-list triklooräädikhape lahust (valkude sadestamiseks) ja filtreerige katseklaaside sisu erinevatesse gradueeritud klaasidesse. Peske filtril olevat sadet 1 ml dest. veega, viige maht 5 ml-ni ja määrake P_i sisaldus mõlemas filtraadis.

P_i määramiseks lisage filtraatidele 1 ml molübdeenreaktiivi, 0,5 ml 0,5%-list külmkapis asuvat askorbiinhappelahust, viige dest. veega maht 10 ml-ni, segage hoolikalt ning täpselt 5 min möödudes määrake P_i optiline tihedus kontroll- ja katsefiltraadis (dest. vee vastu) elektrofotokolorimeetri abil, kasutades 5 mm läbimõõduga küvette. Leidke standardgraafiku abil eraldunud P_i hulk ning väljendage aluselise fosfataasi aktiivsus eraldunud P_i hulgana (mg-des) 100 ml vereseerumi kohta tunnis.

Hüperfosfataseemiat (vereseerumi fosfataasi aktiivsuse tõus) täheldatakse maksahaiguste (mehaaniline kollatõbi) ja luukoe haiguste (rahhiit, pahaloomulised luukasvaja) puhul.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Selgitage, miks maltoos ja glükoos annavad positiivse Trommeri reaktsiooni ja negatiivse jooditesti.
2. Kuidas tõestada, et NaCl aktiveerib sülje amülaasi ja CuSO_4 inhibeerib teda?
3. Milles seisneb Büchneri meetodi ja vereseerumi aluselise fosfataasi määramise põhimõte?

Töö nr. 17. Kvalitatiivsed reaktsioonid vitamiinidele

Vitamiin A

1. Reaktsioon SnCl_2 -ga. Võtke kuiva katseklaasi 1-2 tilka kalamaksaõli ja lisage 4-5 tilka SnCl_2 küllastatud lahust kloroformis. Tekib sinine värvus, mis selämisel muutub roosakaks-violetseks (karotiini olemasolul lahuses tekib rohekassinine värvus). Reaktsiooni saab spetsiifilisuse tõttu kasutada ka vitamiin A kvantitatiivseks määramiseks.

2. Reaktsioon konts. H_2SO_4 -ga. Võtke kuiva katseklaasi 1 tilk kalamaksaõli ja 5 tilka kloroformi, loksutage ning lisage 1 tilk konts. H_2SO_4 . Tekib sinakas värvus, mis läheb üle punakaspruuniks. Reaktsioon on mittespetsiifiline.

Vitamiin D

1. Reaktsioon aniliiniga. Võtke kuiva katseklaasi 2-3 tilka kalamaksaõli ja 10 tilka kloroformi ning lisage (pidevalt segades) 1-2 tilka aniliinreaktiivi. Soojendage ettevaatlikult keemiseni (pidevalt segades) ning keetke pool minutit. Vitamiin D olemasolu tõestab kollase emulsiooni muutumine roheliseks ja siis punaseks. Reaktsioon on mittespetsiifiline.

2. Reaktsioon broomiga. Võtke kuiva katseklaasi 2-3 tilka kalamaksaõli ja 2-4 tilka broomilahust kloroformis. Vitamiin D manulusel tekib rohekassinine värvus. Reaktsioon on mittespetsiifiline.

Vitamiin E

Reaktsioon raud (III) kloriidiga. Võtke kuiva katseklaasi 4-5 tilka 0,1%-list α -tokoferooli alkohollahust, lisage 0,5 ml 1%-list raudkloriidilahust ning segage hoolikalt. Vitamiin E olemasolu tõestab intensiivne punane värvus, mille annab α -tokoferooli oksüdeerimisel raudkloriidiga tekkinud tokoferüülkinoon. Reaktsioon on spetsiifiline ja teda saab kasutada ka vitamiin E kvantitatiivseks määramiseks.

Vitamiin K

Reaktsioon maloonhappe dietüüleetriga. Võtke kuiva katseklaasi umbes 2,5 ml uuritavat lahust ning lisage 0,5 ml 1%-list maloonhappe dietüüleetri alkohollahust ja 0,1 ml 1%-list NaOH-lahust. Vitamiin K olemasolu tõestab punakasvioletne värvus. Reaktsioon on mittespetsiifiline.

Vitamiin B₁

1. Reaktsioon diasoreaktiiviga leeliselises keskkonnas. Võt-

ke katseklaasi võrdsetes kogustes (0,5 ml) diasoreaktiivi I (1%-line sulfanüülhape) ja II (5%-line NaNO_2) ning asetage vedeliku pinnale klaaspulgakese abil mõni kristall tiamiini. Hoides katseklaasi kaldu, kihitage ettevaatlikult lahuse pinnale 5-7 tilka 10%-list NaHCO_3 -lahust. Kahe lahuse piirpinnal tekib oranži värvusega ring. Reaktsioon on mittespetsiifiline.

2. Tiamiini oksüdeerumine kaaliumferritsüaniidiga tiokroomiks. Võtke katseklaasi 1 tilk 5%-list tiamiinilahust, 5-10 tilka 10%-list NaOH -lahust, 1-2 tilka 5%-list $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -lahust ja loksutage segu. Lülitades sisse fluorooskoobi, soojendades teda 10 min. ja suunates selle lahusele, ilmneb sinine fluorestsents, mille annab ultraviolettkirte toimel tiamiinist tekkinud tiokroom. Reaktsiooni saab kasutada ka tiamiini kvantitatiivseks määramiseks.

Vitamiin B₂

Riboflaviini redutseerumine leukoflaviiniks. Võtke katseklaasi 8-10 tilka vitamiin B₂ 0,025%-list lahust, 5 tilka konts. HCl ja lisage väike tüki metalset tsinki. Kollane riboflaviini lahus redutseerub üle punase rodoflaviini värvuse tuks leukoflaviiniks. Taandumine toimub HCl -ist Zn toimel eraldunud vesiniku arvel.

Vitamiin PP

Reaktsioon vaskatsetaadiga. Võtke katseklaasi 20 tilka eelnevalt hästi loksutatud 3%-list vitamiin PP lahust, lisage 0,8 ml 10%-list CH_3COOH ja kuumutage segu keemiseni. Keetava lahusele lisage 0,8 ml 5%-list vaskatsetaati ning jahutage segu kraanivee joa all. Sadeneb sinise värvusega halvasti lahustuv nikotiinhappe vasesool. Reaktsioon leiab kasutamist ka vitamiin PP kvantitatiivseks määramiseks.

Vitamiin B₆

Reaktsioon FeCl_3 -ga. Võtke katseklaasi 5 tilka 1%-list vitamiin B₆ lahust, 5 tilka 1%-list FeCl_3 -lahust ning segage hoolekalt. Tekib punase värvusega raudfenolaadi tüüpi ühend. Reaktsioon on mittespetsiifiline.

Vitamiin B₁₂

Reaktsioon tiokarbamiidiga. Kandke väikesele soolavale filtrile 2-3 tilka 10%-list tiokarbamiidilahust, kuiva-

tage see gaasipõleti leegil võrkrestil, lisage 1-2 tilka vitamiin B₁₂ mineralisaati* ja kuumutage filtrit uuesti. Filtrile (enamasti selle servadele) tekib roheline värvus, mille annab koobalti ionide ja tiokarbamiidi reageerimisel tekkinud koobaltrodaniid. Reaktsioon on spetsiifiline ning teda saab kasutada ka vitamiin B₁₂ kvantitatiivseks määramiseks.

Töö nr. 18. Vitamiinide kvantitatiivne määramine

Mõningaid töös nr. 17 toodud reaktsioone saab kasutada ka vastava vitamiini hulga leidmiseks bioloogilises materjalis või lahuses, määrates fluorestsentsi või värvuse intensiivsust. Antud töös toome kvantitatiivse määramise näidete-na vitamiinide P ja C määramise.

1. Vitamiin P (rutiini) kvantitatiivne määramine permangano-meetria abil tees

Meetod baseerub KMnO₄ võimel oksüdeerida rutiini. Indikaatorina kasutatakse indigokarmiini, mis astub reaktsiooni KMnO₄-ga peale kogu rutiini oksüdeerimist. Eksperimentaalselt on kindlaks tehtud, et 1 ml 0,1 N KMnO₄ oksüdeerib 6,4 µg rutiini.

T ö ö k ä i k

Lisage 100-le mg teele 50 ml kuuma dest. vett ja ekstra-heerige 5 minutit. Viige 10 ml ekstrakti kolbi, lisage 10 ml dest. vett ja 5 tilka indigokarmiini (tekib sinine värvus) ning tiitrige (mikrobüretist) 0,05 N KMnO₄-lahusega püsiva kollase värvuse tekkeni. Arvutage rutiini sisaldus tees järg-mise valemi abil

$$\text{Vitamiin P sisaldus (\%)} = \frac{3,2 \cdot A \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot P \cdot 1000}, \text{ kus}$$

3,2 - standardkoefitsient;

A - tiitrimiseks kulunud 0,05 N KMnO₄ hulk, ml;

V₁ - ekstraheerimiseks lisatud vedeliku hulk, ml;

V₂ - tiitrimiseks võetud lahuse hulk, ml;

P - uuritava aine kaalutis, mg;

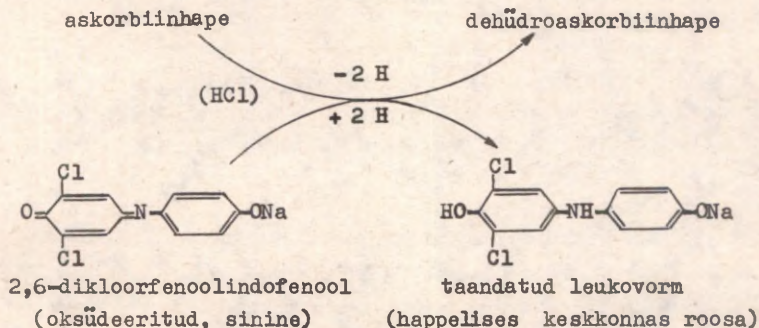
100 - aine üldhulk protsentuaalse sisalduse arvutamiseks;

1000 - mikrogrammide teisendamine milligrammideks.

* Mineralisaadi saamiseks valatakse üks ampull vitamiin B₁₂ katseklaasi, lisatakse 3-5 tilka konts. H₂SO₄ ja põletatakse värvusetuks muutumiseni ning lisatakse (ettevaatlikult!) 1 ml H₂O.

2. Vitamiin C kvantitatiivne määramine

Vitamiin C määramine põhineb tema taandaval toimel 2,6-dikloorfenoolindofenoolisse. Viimane (omab neutraalses ja aluselises keskkonnas sinist värvust, happelises keskkonnas punast värvust) redutseerub seejuures värvituks leukoühendiks, askorbiinhape oksüdeerub dehüdroaskorbiinhappks. Et vältida vitamiin C lagunemist uuritavas lahuses, tiitritakse teda happelises keskkonnas 2,6-dikloorfenoolindofenooliga roosa värvuse tekkeni.



a) Vitamiin C määramine mitmesugustes taimsetes produktides T ö ö k ä i k

Kaaluge 5 g uuritavat ainet ja hõõruge ta portselanuuhmis vähese klaasipuru ja 20 tilga 10%-lise HCl-ga ühtlaseks homogenaadiks, lisades portsjonite kaupa 15 ml dest. vett. Valage saadud mass 100 ml-~~sesse~~ mõõtkolbi, loputage uhmer vähese hulga dest. veega ja lisage see samuti mõõtkolbi. Täitke kolb dest. veega märgini, mõõtke 20 ml segu kolbi ja tiitrite 0,001 N 2,6-dikloorfenoolindofenooli lahusega roosa värvuseni (peab püsima 30 sek.). Korrake tiitrimist teise 20 ml-lise ekstrakti hulgaga ja arvutage vitamiin C sisaldus mg-des 100 g uuritava produkti kohta järgmise valemi abil:

$$\text{vitamiin C sisaldus (mg-des 100 g produkti kohta)} = \frac{0,088 \cdot A \cdot B \cdot 100}{C \cdot D},$$

kus 0,088 - vitamiin C hulk, mis vastab 1 ml 0,001 N 2,6-dikloorfenoolindofenoolile;

A - tiitrimisel kulunud 2,6-dikloorfenoolindofenooli hulk, ml;

B - ekstrakti üldhulk, ml;

- C - tiitrimiseks võetud ekstrakti hulk, ml;
- D - analüüsiks võetud produkti kogus, g;
- 100 - üleminek 100 g-le produktile.

b) Vitamiin C määramine uriinis

Vitamiin C hulk uriinis peegeldab tema varude olemasolu organismis, kuna eksisteerib korrelatsioon vitamiin C sisalduse vahel veres ja tema hulga vahel, mis eritub uriiniga. Kui tervetele inimestele manustada per os 100 mg vitamiini C, tõuseb tema hulk kiiresti veres ja uriinis. Kuid vitamiin C hüpvitaminoosi puhul ei vii per os manustamine alati vitamiin C hulga tõusule uriinis, sest sel puhul liigne vitamiini hulk peetub organismis. Lastel väheneb vitamiin C hulk uriinis skorbuidi ning akuutsete ja krooniliste nakkushaiguste korral. Vitamiin C kogus terve inimese uriinis on 113,55-170,33 µmooli ööpäeva kohta.

T ö ö k ä i k

Mõõtke kolbi 10 ml uriini, 10 ml dest. vett, segage nad hoolikalt läbi ning lisage 20 tilka 10%-list HCl-lahust. Tiitrige 0,001 N 2,6-dikloorfenoolindofenooliga roosa värvuseni ning arvutage vitamiin C sisaldus järgmise valemi abil:

$$\text{Vitamiin C hulk (mg ööpäevas)} = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{C}, \text{ kus}$$

- A - tiitrimiseks kulunud 0,001 N 2,6-dikloorfenoolindofenooli hulk, ml;
- B - ööpäevane uriini kogus, ml (meestel - 1500 ml, naistel - 1200 ml);
- C - tiitrimiseks võetud uriini kogus, ml.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Selgitage (lühidalt) juhendis toodud vastavate vitamiinide määramismeetodit.
2. Milliseid meetodeid saab kasutada (ja kuidas) antud vitamiini määramisel?
3. Kirjutada askorbiinhappe reaktsioon 2,6-dikloorfenoolindofenooliga.
4. Kasutades vastavat kirjandust, koostage tabel vitamiin C sisalduse kohta põhilistes puu- ja köögiviljades (õun, ploom, kapsas, kartul, kaalikas, porgand jt.).

Töö nr. 19. Heemi kvalitatiivne ^{ma}aramine

Heem koensüümina kuulub tsütokroomide, peroksüdaaside ja katalaasi koostisse. Vere hemoglobiin ja tema derivaadid käituvad pseudoperoksüdaasina (erinevalt tõelisest peroksüdaasist ei kaota ensümaatilisi omadusi peale keetmist), oksüdeerides H_2O_2 manulusel guajakivaigus sisalduvaid polüfenoolide, millel põhinebki antud reaktsioon.

T ö ö k ä i k

Võtke kahte katseklaasi umbes 4 ml lahjendatud verd (lahus on väga nõrga punaka värvusega) ning keetke ühte katseklaasi 1-2 minutit. Peale jahutamist lisage mõlemasse klaasi umbes 1 ml guajakivaigulahust ja mõni tilk H_2O_2 . Mis tekib? Et reaktsioon on väga tundlik (võimaldab verd avastada lahjenduses kuni 1:10 000), kasutatakse teda kliinilises praktikas vere väikeste hulkade avastamiseks maomahlas, urinis, fekaalides. Reaktsiooni kasutatakse ka kohtumeditiinis.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Tooge kõigi meetodite põhimõtte, millega saab ^{ma}arata:

a) prosteetilisi rühmi kui kofaktoreid, b) koensüüme.

Töö nr. 20. Aminohappelise, peptiidse ja valgulise loomusega hormoonide ^{ma}aramine

1. Insuliini ^{ma}aramine. Insuliin annab valkudele iseloomulikke värvusreaktsioone (näit. biureedireaktsioon).

T ö ö k ä i k

Võtke katseklaasi 0,5 ml insuliinilahust ning lisage 5 tilka 10%-list NaOH-lahust ja 1 tilk 1%-list $CuSO_4$ -lahust. Insuliini olemasolu tõestab sinakasvioletne värvus.

2. Adrenaliini ^{ma}aramine. Pürokatehhinrõngast sisaldavad hormoonid (adrenaliin, noradrenaliin) annavad raudkloriidiga rohelise värvusega kompleksi.

T ö ö k ä i k

Võtke katseklaasi 8-10 tilka adrenaliinilahust ja lisage 1 tilk 1%-list $FeCl_3$ -lahust. Adrenaliini olemasolu tõestab roheline värvus, mis 3 tilga 10%-lise NaOH-lahuse lisamisel muutub kirsipunaseks.

3. Türoksiini (T_4) ^{ma}aramine. Kilpnäärme koest valmistatud hormoonpreparaadi türeoidiini hüdrolüüsil tekib KI, millest KIO_3 toimel eraldub vaba jood. Viimast tõestatakse happelises keskkonnas tärkliselahuse abil.

T ö ö k ä i k

Hõõruge 5 tabletti türeoidiini uhmris peeneks pulbriks, kand-
ke see pulber katseklaasi, lisage 5 ml 10%-list NaHCO_3 , 5 ml
dest. vett ja keetke vesivannil 15 minutit. Lisage 1 ml-le
hüdrolüsaadile (tilkhaaval) 10%-list H_2SO_4 -lahust (happelise
reaktsioonini), siis lisage 3 tilka 1%-list tärkliiselahust
ning 0,5 ml 2%-list KIO_3 -lahust (viimast mitte liias lisada).
Tekib sinine värvus.

Töö nr. 21. Steroidhormoonide määramine

1. Östrooni määramine. Östrooni fenoolne grupp annab leeli-
selises keskkonnas Folini reaktiiviga sinise värvus.

T ö ö k ä i k

Võtke katseklaasi 2 tilka östroonilahust ja 1 tilk 30%-list
 NaOH -lahust ning lisage 1 tilk Folini reaktiivi. Östrooni
olemasolu tõestab sinine värvus.

2. 17-oksosteroidide kvalitatiivne ja kvantitatiivne määra-
mine uriinis. 17-oksosteroidid on neerupealiste koorolluse
hormoonide (hüdrokortisoon, kortisoon) ning osaliselt ka su-
guhormoonide (androsteroon, östroon) metabolismi lõpp-produk-
tid, mis väljutatakse uriiniga. 17-oksosteroidid annavad m-
dinitrobenseeniga (aluselises keskkonnas) roosakasvioletse
kondensatsiooniproducti, mis omab neeldumismaksimumi 530 nm
juures. Sellel rajanebki nende määramine.

a) Kvalitatiivne määramine*

T ö ö k ä i k

Võtke kuiva katseklaasi 10 tilka uriini ning lisage kuiva
pipetiga 15 tilka 2%-list m-dinitrobenseeni piirituslahust.
Segage segu hoolikalt läbi ning lisage 3 tilka 30%-list
 NaOH -lahust kuni tekib (kulub kuni 2 minutit) roosakasvio-
letne värvus.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Loetlege kõik värvusreaktsioonid, mida saab kasutada val-
guliste hormoonide tõestamiseks.
2. Millel baseerub adrenaliini, noradrenaliini määramine?

* Zimmermanni reaktsioon

Too nr. 22. Maomahla patoloogiliste komponentide identifitseerimine

Maomahla patoloogiliste komponentide hulka kuuluvad piimhape, nn. lenduvad rasvhapped (võihape, aadikhape), verepigmentid jt.

T ö ö k ä i k

a) Piimhappe tõestamine. Võtke 5 tilka patoloogilist maomahla ja lisage tilkhaaval Uffelmanni reaktiivi (20 tilka 1%-list fenoolilahust + 2 tilka 1%-list FeCl_3 -lahust) kuni kollakasroheline värvuse (Fe -laktaadi) tekkeni.

b) Vere tõestamine. Lisage 5 tilgale 1%-lisele bensidiinilahusele 5 tilka 3%-list H_2O_2 -lahust ja 5 tilka patoloogilist maomahla. Vere olemasolu tõestab sinise värvuse (oksüdeeritud bensidiin) teke.

Määramiste kliinilis-diagnostiline tähtsus. Maovähi puhul ilmuvad maomahla piimhape, võihape ja aadikhape mikroorganismide poolt teostatavates käärimisprotsessides. Verepigmentid ilmuvad maomahla maoseinte haavanditest.

Too nr. 23. Pepsiini kvantitatiivne määramine maomahlas

Meetodi aluseks on pepsiooni võime kalgendada piima kaseiini. Seejuures toimub piima-atsetaadi segu kalgendumine pH 4,9 juures (25°C) täpses vastavuses pepsiooni valke seediva võimega. Pepsiini ühikuks loetakse tema hulka, mis nimetatud tingimustes kalgendab 5 ml piima-atsetaadi segu 60 sek jooksul (see tinglik ühik vastab 0,010 mg kristalsele pepsiinile). Inimese maomahla normaalne pepsiinisisaldus 1 ml-s on 40-60 pepsiooni ühikut.

T ö ö k ä i k

Võtke esimesse katseklaasi 5 ml piima-atsetaadi segu ja teise katseklaasi põhja 0,1 ml maomahla ning asetage mõlemad katseklaasid 5 min. vesivanni (25°C). Seejärel valage kiiresti esimese katseklaasi sisu teise katseklaasi (kävitatades samaaegselt stopperi) ning loksutage katseklaasi. Hoidke katseklaasi veevannis kaldu ning fikseerige stopperil aeg (sekundites), millal katseklaasi seintele ilmusid esimesed kaseiinihelbed. Leidke pepsiooni hulk 1 ml-s maomahlas järgmise valemi abil:

$$x = \frac{60 \cdot 0,01}{a}, \text{ kus}$$

x - pepsiini hulk 1 ml maomahlas (ühikutes),
 a - aeg, mis kulus segu kalgendamiseks (sek),
 0,01 - üleminek ühele ml-le.

Korrutades saadud tulemuse 0,010-ga saame 1 ml maomahlas leiduva kristalse pepsiini hulga mg-des.

Määramise kliinilis-diagnostiline tähtsus. Pepsiini hulga oluline tõus maomahlas peegeldab mao haavandtõbe.

Kontrollküsimused laboratoorse töö kohta

1. Kuidas tõestada piimhappe ja vere olemasolu maomahlas?
2. Milles seisneb maomahla uuringute kliinilis-diagnostiline tähtsus?

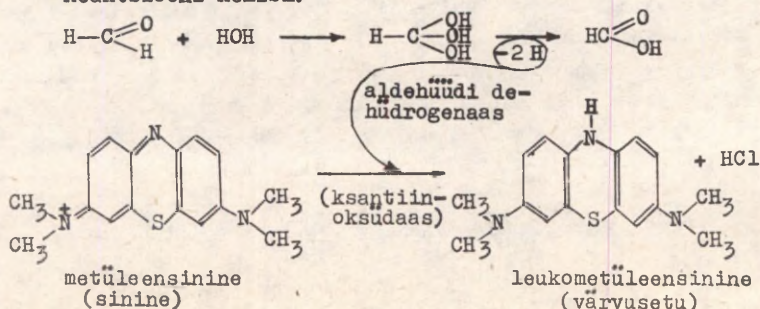
Töö nr. 24. Aldehüüdi dehüdrogenaasi tõestamine piimas

Dehüdrogenaasid katalüüsivad vesinikuaatomite eraldamist S-lt ja nende ülekandmist H-aktseptoritele. Katsetingimustes võib aktseptorina kasutada värvaineid, mis redutseerumisel valastuvad (näit. metüleensinine). Antud töös uuritakse ksantiini oksüdaasi, mille toimel hüpoksaantiin oksüdeerub ksantiiniks ja edasi kusihaapeks. Et antud E töötab ka aldehüüdide oksüdeerijana, nimetatakse teda ka aldehüüdi dehüdrogenaasiks. Nimetatud ensüümi leidub loomorganismis, taimesdes ja ka piimas.

T ö ö k ä i k

Võtke 2 katseklaasi 2 ml värsket piima, 3-dasse katseklaasi aga 2 ml keedetud ja jahutatud piima. Lisage 1-nessse ja 3-dasse katseklaasi 2 tilka formaldehüüdi ja metüleensinise segu, 2-se katseklaasi aga 2 tilka metüleensiniselahust. Anaeroobsete tingimuste loomiseks tilgutage igasse katseklaasi 6 tilka vaseliinõli ning asetage katseklaasid 20 min. termos- taati (37°C). Selgitage katse tulemusi!

Reaktsiooni kemism:



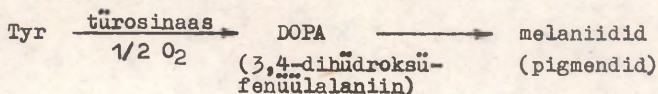
Töö nr. 25. Oksüdaaside toime uurimine

Oksüdaasid katalüüsivad S oksüdeerimist molekulaarse hapniku (redutseerivate elementide aktseptor) abil.

a) Oksüdaaside toime jälgimine türosiinil. Kuna kartulis leidub fenooloksüdaaside hulka kuuluv türosinaas* (katalüüsib monofenoolide, näit. Tyr, ja polüfenoolide oksüdeerumist), siis töö läbiviimiseks tuleb valmistada kartuliekstrakt. Lõigake 5 g kooritud kartulit väikesteks tükkideks, hõõruge tükid uhmris klaasipuruga peeneks, lisage 20 ml vett ning filtrige segu läbi (filtraati kasutage ekstraktina selles ja järgmises töös).

Mõõtke katseklaasi 2 ml türosiinilahust, lisage 2 ml kartuliekstrakti, loksutage ja asetage katseklaas termostaati. Jälgige värvuse muutumist, loksutades aeg-ajalt katseklaasi sisu paremaks kokkupuutumiseks hapnikuga.

Tyr oksüdeerimise reaktsioon:



b) Oksüdaaside toime jälgimine guajakivaigul. Mõõtke 3 katseklaasi 3 ml kartuliekstrakti. Keetke teises katseklaasis olevat ekstrakti (1 min.) ja lisage kolmandasse katseklaasi 8 tilka NaCN-lahust. Järgnevalt lisage igasse katseklaasi 0,5 ml guajakivaigu (sisaldab polüfenooli) alkoholset lahust. Selgitage katse tulemusi.

c) Kvalitatiivne reaktsioon tsütokroomoksüdaasile (cyt a + a₃). Cyt a + a₃ on ensüümkompleks, mis sisaldab hemiinset rauda, vaseioone ning mis annab e vahetult üle õhuhapnikule. Cyt a + a₃ oksüdeerib hapniku juuresolekul peale cyt c ka mõningaid teisi ühendeid (näit. dimetüülparafenüleendiamiini** ja α-naftooli). Cyt a + a₃ inaktiveerub tsüaniidide toimel.

T ö ö k ä i k

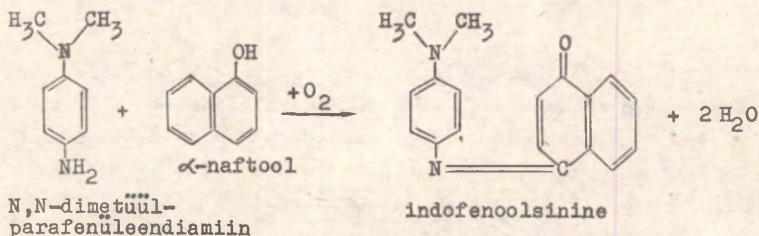
Võtke 5 g rasvast vabastatud skeletilihaskude, peenestage see käärdega ning hõõruge uhmris 4-kordse mahu külma dest.

* türosinaasi leidub ka loomorganismis, kus tema toimel tekivad Tyr metabolismis naha- ja juustepigmentid

** N,N-dimetüülbenseenidiamiin

veega peeneks. Filtrige lihaspasta läbi 2-kordse marli ning peske külma dest. veega, kuni pesuvesi enam ei värvu (pasta ise muutub ka praktiliselt värvusetuks). Kuivatage saadud pasta filterpaberiga. Pasta sisaldab $\text{cyt} + \text{a}_3^*$, cyt -de kompleksi ja mõningaid dehüdrogenaase, elimineeritud on redutseerivad ained ning veeslahustuvad E-d. Jagage pasta võrdseks kahele filterpaberile, viige üks portsjon katseklaasi, lisage 1 ml dest. vett, keetke 1 min, jahutage, valage vedelik ära ning kandke pasta uuesti filterpaberile. Lisage järgnevalt nii keetmata kui keedetud pastale 3 tilka värskest valmistatud segu (koosneb võrdsetest osadest 1%-lisest dimetüülparafenüleendiamiini lahusest, 1%-lisest α -naftooli alkoholsest lahusest ja 1,5%-lisest Na-karbonaadi lahusest). Mõne minuti jooksul värvub keetmata pasta siniseks, kuna tekib α -naftooli ja dimetüülparafenüleendiamiini oksüdeerimise ja kondensatsiooni produkt (indofenoolne sinine). Selgitage tulemusi!

Reaktsiooni kemism:



d) Cyt c redutseerimine. Cyt c osaleb hingamisahelas \bar{e} transpordis. Seejuures taandub hemiinne raud kahevalentseks. Cyt c organismiväline redutseerumine vajab konts. HCl ja metallilise tsingi manulust.

T õ õ k ä i k

Võtke ühte katseklaasi pisut cyt c lahust ning teise katseklaasi pisut konts. HCl. Lisage teise katseklaasi tükike metallilist tsinki, sulgege katseklaas korgiga, mida läbib gaasijuhtetoru ning juhtige tekkiv vesinik katseklaasis olevasse cyt c lahusesse (punane lahus muutub heledamaks). Kui

* on tugevalt seotud rakustruktuuridega

jätta cyt c lahuse seisma, omandab see jälle esialgase värvuse. Selgitage asetleidvaid nähtusi!

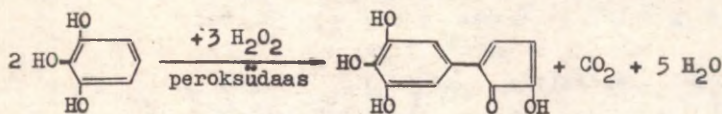
Töö nr. 26. Peroksüdaaside ja katalaasi toime uurimine

Peroksüdaasid ja katalaasid on hemiinsed E-d, mis osalevad oksüdatsiooniprotsessides tekkiva H_2O_2 kahjutustamises (muudavad H_2O_2 veeks ja hapnikuks). Selles protsessis toimub E molekulis oleva raua oksüdeerumine ja redutseerumine. Peroksüdaasid katalüüsivad mõnede fenoolide, polüfenoolide ning aroomaatsete amiinide oksüdeerumist peroksiidide (näit. H_2O_2) hapniku arvel. Peroksüdaasid on laialdasemalt levinud taimes, neid leidub ka loomorganismis. Katalaasi on leitud loomorganismides kõigis kudedes ja ka biovedelikes. Eriti rohkesti on teda erütrotsüütide stroomas ja maksas.

a) Peroksüdaaside toime pürogalloolile (töö läbiviimiseks valmistatakse määrõikaekstrakt). Hõõruge 3 g peeneks lõigatud määrõigast uhmris klaasipuruga peeneks, lisage 15 ml dest. vett, segage ja jätke 30 min. seisma. Filtrige saadud segu ning kasutage filtraati kui peroksüdaase sisaldavat ekstrakti.

T ö ö k ä i k

Võtke nelja katseklaasi 3 ml värskest valmistatud 1%-list pürogalloolilahust. Lisage esimesse katseklaasi 1 ml 3%-list H_2O_2 ja 1 ml H_2O , teise katseklaasi 1 ml 3%-list H_2O_2 ja 1 ml määrõikaekstrakti, kolmandasse katseklaasi 1 ml 3%-list H_2O_2 ja 1 ml keedetud määrõikaekstrakti ning neljandasse katseklaasi 1 ml H_2O ning 1 ml määrõikaekstrakti. Selgitage tulemusi!



pürogallool

purpurogalliin

(punane, raskesti lahustuv)

b) Vere katalaasi inhibeerimine. Võtke kahte katseklaasi umbes 3 ml lahjendatud (1:30) verd, lisage esimesse paar tilka 0,1 M NaCN-lahust ning segage segi. Järgnevalt lisage mõlemasse katseklaasi 2-3 ml 3%-list H_2O_2 . Selgitage tulemusi!

S I S U K O R D

	lk.
Sissejuhatus	3
Praktikumi nr.	Teema
1. Biokeemia tekke ja arengu lühiajalugu. Bio- keemias enamasutatavad füüsikalis-keemili- sed meetodid	4
2. a) Aminohapete ja valkude kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine	21
b) Valkude struktuur ja füsikeemilised omadused	33
3. a) Süsivesikute kvalitatiivne ning kvantitatiivne määramine	42
b) Lipiidide kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine	45
4. Nukleiinhapete ja nende komponentide kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine	47
5. Ensüümid	50
6. Vitamiinide kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine	59
7. Kofaktorid (koensüümid) ja nende määramine ..	64
8. Hormonaalne regulatsioon, hormoonide kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine	75
9. Metabolismi uurimise meetodid. Toitumise ja seedimise biokeemia	88
10. Biokeemiliste reaktsioonide energeetilised aspektid. Bioloogilise oksüdatsiooni ensüümid	105
11. Fotosüntees	116
Laboratoorsed tööd	123